

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



O papel dos cílios e da sinalização Hedgehog (Hh) na
regeneração da barbatana caudal de larvas de peixe-zebra

Joana Helena Esteves de Lima

MESTRADO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA E DO DESENVOLVIMENTO

2010

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



O papel dos cílios e da sinalização Hedgehog (Hh) na
regeneração da barbatana caudal de larvas de peixe-zebra

Joana Helena Esteves de Lima

Dissertação de mestrado orientada por:
Doutora Susana Pascoal IMM/FMUL, ECS Universidade do Minho (orientador externo)
Doutor Gabriel Martins CBA/FCUL (orientador interno)

MESTRADO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA E DO DESENVOLVIMENTO

2010

Agradecimentos

Durante o último ano integrei a tempo inteiro neste projecto de investigação científica, o qual me fez crescer não só a nível prático e crítico como também a nível pessoal, e me deu muito gosto fazer.

Primeiro, gostaria de agradecer especialmente à Susana Pascoal por me ter aceite como estudante de mestrado, por ter acreditado em mim e por me ter ensinado praticamente tudo no laboratório. Por me ter dado a possibilidade de começar a minha vida científica num projecto tão aliciante; por ter sido sempre compreensiva e motivadora.

Gostaria de agradecer à Leonor Saúde, por me ter aceite no seu laboratório e por ter estado sempre presente especialmente na ausência da Susana, nunca me tendo deixado sem apoio.

Ao Gabriel Martins por ter sido um orientador interno sempre disponível.

A todos os membros da UDEV por me terem ajudado de uma forma ou de outra nos momentos de dúvidas e de discussão.

À Lara, ao Fábio e à Patrícia pela ajuda que me deram sem hesitarem sempre que precisei e pelos momentos de boa disposição.

À Diana por toda a amizade, ajuda, boa disposição e boas conversas.

Ao Daniel, por todo o carinho, compreensão e motivação.

À minha família, à minha irmã e acima de tudo gostaria de agradecer aos meus pais por todo o amor e ajuda, por estarem sempre presentes apesar da distância, e sem os quais não estaria a escrever esta tese a quem dedico.

Os cílios são estruturas formadas por microtúbulos, que emergem da superfície das células. Existem vários tipos de cílios, como os cílios primários, sem a capacidade de se moverem, que estão presentes em células monociliadas, e os cílios móveis que estão presentes em células multi-ciliadas. Os cílios primários, presentes em quase todo o tipo de células dos vertebrados são necessários para a transdução de sinal da via Hh (Hedgehog). Vários componentes desta via, como a proteína transmembranar Smo (Smoothed) e os factores de transcrição Gli (Glioma) localizam-se nos cílios primários. Os cílios são organelos necessários à manutenção da homeostase e reparação de diversos tecidos. Assim sendo, é importante averiguar se os cílios desempenham uma função durante a regeneração epimórfica. Este tipo de regeneração, consiste no processo através do qual uma estrutura amputada ou danificada regenera a partir de um blastema, ou seja, de um grupo de células com grande potencial proliferativo e com capacidade de dar origem a diferentes tipos celulares. Durante a regeneração da barbatana caudal de peixe-zebra, as vias FGF (Fibroblast Growth factor), Hh e Wnt (Wingless-Int) actuam de forma interligada para conduzir o processo regenerativo. No presente estudo foram usadas as *fin fold* caudais de larvas de peixe-zebra como modelo de estudo de regeneração. Neste trabalho demonstramos a existência de um evento de ciliogénese caracterizado pelo aumento do tamanho e número de cílios durante o processo regenerativo. Verificámos ainda que a via de sinalização Hh é fundamental para a regeneração da *fin fold* das larvas e sugerimos que este processo possa ocorrer independentemente da presença de cílios.

Palavras-chave: Hh, cílios, regeneração, *iguana*, larvas de peixe-zebra

Cilia are microtubule based organelles that protrude from the cell surface. There are two types of cilia: primary cilia, which are imotile and are solitary structures in the cells; and motile cilia, that occur in multi-ciliated cells. Primary cilia are present in most of the vertebrate cell types and are required for Hh (Hedgehog) signaling transduction. Some proteins of the Hh pathway localize at the cilia, like the transmembranar protein Smo (Smoothened) and the transcription factors Gli (Glioma). Because cilia are required for the homeostasis and repair of several tissues, it is important to understand if these organelles also play a role during epimorphic regeneration. In this process the amputated or injured structure regenerates from a pool of cells, called the blastema that has the capacity to differentiate into different cell types. During regeneration, signaling pathways like FGF (Fibroblast Growth Factor), Hh and Wnt (Wingless-Int) operate to guide the regenerative process. In the present study, we have used zebrafish larvae caudal *fin fold* as a model to study regeneration. We demonstrate that during regeneration a ciliogenic event occurs, which is characterized by an increase in the number and size of cilia. In addition, we show that Hh signaling is required for larvae *fin fold* regeneration and we suggest that this process can occur independently of cilia.

Keywords: Hh, cilia, regeneration, *iguana*, zebrafish larvae

Abreviaturas

ACFP – <i>adult caudal fin primordia</i>	Ptc – Patched
AEC – <i>apical ectodermal cap</i>	Shh – Sonic Hedgehog
BrdU – <i>bromodeoxyuridine</i>	Smo – Smoothened
<i>igu</i> – <i>iguana</i>	SuFu – Supressor of Fused
Ca ²⁺ – cálcio	Wnt – Wingless-Int
DMSO – <i>Dimethyl sulphoxide</i>	Wt – <i>Wild type</i>
dpa – dias pós amputação	ZPA – <i>Zone of Polarizing Activity</i>
dpf – dias pós fertilização	µm – micrómetros
FGF – Fibroblast Growth Factor	µM – micromolar
Fu – Fused	
g – gramas	
Gli – <i>Glioma</i>	
GliA – Glioma Activador	
GliR – Glioma Repressor	
Hh – Hedgehog	
hpa – horas pós amputação	
IFT – <i>intraflagellar transport proteins</i>	
L – litro	
ml – mililitro	
mM – milimolar	
MT – microtúbulos	
PCP – <i>Planar Cell Polarity</i>	
PDGF – Platlet-Derived Growth Factor	
PDGFR – Platlet-Derived Growth Factor Receptor	
PKD – <i>Polycystic kidney disease</i>	

Agradecimentos	I
Resumo	II
<i>Abstract</i>	III
Abreviaturas	IV
Índice	V
Introdução	1
1 – Cílios	1
1.1 – Tipos de cílios	1
1.2 – Cílios primários	2
1.3 – As proteínas do transporte intra-flagelar (proteínas IFT)	4
1.4 – Cílios e via de sinalização <i>Hedgehog</i> (Hh)	5
1.5 – O mutante <i>iguana</i>	8
1.6 – Diversidade entre espécies	9
2 – Regeneração	11
2.1 – Tipos de regeneração	11
2.2 – Processos da regeneração epimórfica	12
2.3 – Regeneração da barbatana caudal – adulto vs larva	15
Objectivos	18
Materiais e Métodos	19
1 – Manutenção e manipulação das larvas de peixe-zebra	19
1.1 – O mutante <i>iguana</i>	19
1.2 – Químicos	19
2 – Sondas de RNA	20
3 – Hibridação <i>in situ</i> – whole mount	21
4 – Imunohistoquímica	23
4.1 – Protocolo de imunohistoquímica para a detecção de cílios	23
4.2 – Protocolo de imunohistoquímica para a detecção de proliferação	24
4.3 – Anticorpos	25
5 – Aquisição e análise de imagem	25
5.1 – Medição da área regenerada das barbatanas caudais das larvas	26

5.2 – Contagem dos cílios	26
5.3 – Contagem dos núcleos	27
6 – Estatística	27
 Resultados	 28
1 – A amputação da <i>fin fold</i> promove ciliogénese	28
2 – O processo regenerativo na ausência de cílios	31
3 – Regeneração na ausência de sinalização Hh	34
4 – Modulação da via de sinalização Hh durante a regeneração	36
5 – As larvas mutantes para <i>iguana</i> revelam a existência de regeneração na ausência de proliferação celular	38
 Discussão	 41
1 – Processo de ciliogénese como resposta a uma lesão	41
1 – A sinalização Hh e o processo regenerativo	43
1.1 – A sinalização Hh na regeneração de larvas de peixe-zebra	43
1.2 – A sinalização Hh na regeneração do mutante <i>iguana</i>	44
2 – O papel da proliferação celular na regeneração da <i>fin fold</i>	44
3 – A relação dos cílios e da sinalização Hh na regeneração da barbatana caudal de larvas de peixe-zebra	46
 Conclusão	 48
 Bibliografia	 49

1 – Cílios

Os cílios são organelos celulares que se expandem a partir da superfície das células e que estão envolvidos em várias doenças que afectam os seres humanos, nomeadamente esterilidade, hidrocefalia, cegueira, aleatorização do eixo esquerda-direita, doenças respiratórias, presença de quistos nos rins e pâncreas. No entanto, apenas recentemente foram feitos estudos que associam os cílios a estas diversas doenças (revisto por Eggenschwiler e Anderson, 2007).

Os cílios são formados por microtúbulos que se organizam em protofilamentos associados entre si, formados por uma cadeia de heterodímeros de *alfa* e *beta* tubulina. Os microtúbulos organizam-se em nove dupletos orientados perifericamente apresentando uma estrutura em 9+0, ou em 9+2 quando existe ainda um par central de microtúbulos. Ao conjunto dos microtúbulos dá-se o nome de axonema (Fig.1). O axonema forma-se através da polimerização dos microtúbulos a partir do corpo basal, conferindo sustentabilidade ao cílio. O corpo basal (Fig.1C) é uma sub-estrutura do cílio formada a partir de um centríolo modificado que ancora na membrana plasmática e apresenta uma estrutura microtubular de nove tripletos (revisto por Praetorius e Spring, 2005).

1.1 – Tipos de cílios

A classificação dos cílios das células eucariotas foi feita de acordo com a sua capacidade móbil, estes podem ser cílios não móveis ou primários ou cílios móveis ou secundários (Fig.1) (Williams *et al.*, 1989). Normalmente os cílios primários são estruturas singulares presentes em células mono-ciliadas. Por outro lado, os cílios móveis estão presentes em grande número em células multi-ciliadas. Os cílios móveis, apresentam um axonema em 9+2 (Fig.1A), ou seja, são formados por nove pares de microtúbulos organizados perifericamente em dupletos e um par central de microtúbulos individualizados

(revisto por Christensen *et al.*, 2007). Por outro lado, os cílios primários, normalmente não móveis têm um axonema em 9+0 (Fig.1B), em que não existe o par central (revisto por Christensen *et al.*, 2007). Para além desta diferença estrutural do axonema existem outras características que conferem aos cílios secundários a sua capacidade móbil: apresentam projecções radiais, que consistem num complexo de proteínas que se organizam ligando-se ao sub-túbulo A de cada um dos nove dupletos de microtúbulos periféricos, orientando-se na direcção do par central, e um complexo de motor de dineínas com projecções que se estendem para a direcção interna e externa do axonema, também a partir do sub-túbulo A (revisto por Praetorius e Spring, 2005).

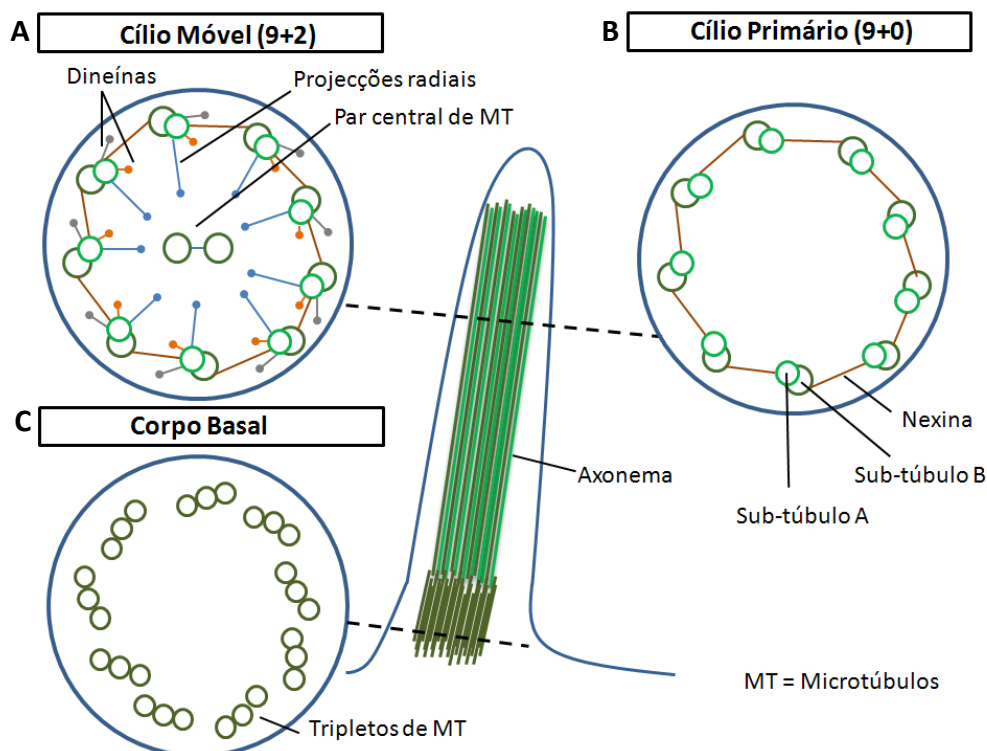


Fig.1 - Corte transversal de um cílio móvel (A), de um cílio primário (B) e do corpo basal (C). O cílio primário não apresenta os motores de dineína, as projecções radiais nem o par central de microtúbulos (MT) que conferem a capacidade móbil aos cílios móveis.

1.2– Os cílios primários

A função exercida pelos cílios móveis nos diversos tecidos em que se encontram foi facilmente associada à sua capacidade móbil, mas a função dos cílios primários, não tão aparente, levou a que no passado tenham sido considerados estruturas sem importância fisiológica. Todavia, na última década

os estudos em cílios primários foram retomados, originando descobertas de grande impacto. Inicialmente, o seu papel foi estudado em apenas alguns tipos de células em que os cílios apresentam funções especializadas. É o caso dos cílios do complexo sensorial dos neurónios olfactivos, em que os cílios contêm nas suas membranas receptores olfactivos; e os dos segmentos externos dos fotorreceptores, células neuronais especializadas que se encontram na retina. Os cílios destas células, por processos de invaginações e evaginações membranares vão formar os segmentos externos, estruturas especializadas na fototransdução (revisto por Eggenschwiler e Anderson, 2007).

A presença dos cílios primários em células que não apresentavam funções especializadas continuou a ser um enigma, até que se verificou que os cílios primários, normalmente estruturas solitárias, existem em quase todas as células dos vertebrados (Wheatley, 1995). Assim, começaram a ser desenvolvidos estudos para tentar perceber o porquê da presença de cílios primários de forma individual nas diferentes células. As primeiras descobertas relativamente à função dos cílios primários foram feitas através de estudos fisiológicos em células de rim em cultura, o que levou à descoberta da sua capacidade mecano-receptora de sentir os fluxos (Schwartz *et al.*, 1997; Praetorius e Spring, 2001; Liu *et al.*, 2003). Os cílios primários destas células têm a capacidade de se dobrarem como resposta a um fluxo imposto, semelhante ao exercido nos túbulos renais. Posteriormente, demonstrou-se que esta característica dos cílios está relacionada com a sinalização celular, isto é, o cílio funciona como um sensor do fluxo, em que ao dobrar-se leva a um aumento do influxo de cálcio intracelular, o que não se verifica sem a presença de cílios (Praetorius e Spring, 2001; 2003). Os canais de cálcio envolvidos neste processo estão localizados no cílio e são designados de policistinas (Nauli *et al.*, 2003). A investigação continuada da função dos cílios a nível dos túbulos renais levou mais tarde à associação da perda da capacidade mecano-receptora dos cílios com a doença dos rins policísticos (PKD, *polycystic kidney disease*), (Nauli e Zhou, 2004) apesar de não ser ainda claro como é que tal se verifica. A função mecano-receptora dos cílios foi também descoberta noutros tipos celulares, como os osteócitos (Whitfield, 2003) e condrócitos (Poole *et al.*, 1997; Jensen *et al.*, 2004).

No entanto, a presença de cílios primários em tecidos nos quais não se reconhece qualquer função mecano-receptora, como por exemplo no tecido nervoso, muscular, endócrino, mesênquimatoso, etc, levaram a acreditar que os cílios primários desempenham outras funções para além das de mecano-recepção.

Estudos recentes demonstram que os cílios primários funcionam como uma antena da célula coordenando a transdução de sinais importantes para o desenvolvimento embrionário e para a homeostase dos tecidos adultos. Algumas vias de sinalização precisam de cílios primários para que a transdução de sinal se dê correctamente, estando presentes no cílio componentes dessas mesmas vias de sinalização, como a de Hh (Hedgehog), PDGFR α (Platelet-Derived Growth Factor Receptor α) (revisto por Eggenschwiler e Anderson, 2007) e a via não canónica de Wnt (Wingless-Int), designada de PCP (Planar Cell Polarity) (revisto por Satir *et al.*, 2010).

1.3 – As proteínas do transporte intra-flagelar (proteínas IFT)

Depois do centríolo se ancorar à membrana, é necessário que ocorra o transporte de proteínas ciliares para que se dê o alongamento do cílio, este transporte é realizado pelas proteínas de transporte intraflagelar (IFT). Estas proteínas apresentam um sistema de transporte bidireccional e encontram-se entre os dupletos de microtúbulos periféricos do axonema e a membrana ciliar.

As proteínas intraflagelares foram primeiramente identificadas na alga *Chlamydomonas* e foram agrupadas em dois complexos A e B, tendo sido descobertas cerca de 16 destas proteínas (Cole *et al.*, 1998; Piperno e Mead, 1997). A deslocação das IFT ao longo do axonema foi visualizada pela primeira vez, através do uso da microscopia de DIC (microscopia diferencial de contraste de interferência) por Kozminski em 1993.

As proteínas IFT são transportadas para a extremidade positiva dos microtúbulos que se encontra na parte mais distal do cílio através de um movimento anterógrado facultado pelo complexo motor cinesina-2 (também designado de complexo motor KIF3) (Fig.2A). O movimento retrógrado dá-se na direcção da base do cílio e é conferido pelo motor de dineína (Fig.2B).

Foi verificado em diversos organismos que a perda de proteínas do complexo IFT B ou do motor cinesina-2 origina ausência de cílios, enquanto a perda do motor retrógrado do complexo dineína ou das IFT do complexo A não impede a formação do cílio mas dá origem a que este não se forme de maneira correcta (revisto por Pedersen *et al.*, 2008). Assim, as IFT B e o motor cinesina-2 são essenciais para a formação dos cílios.

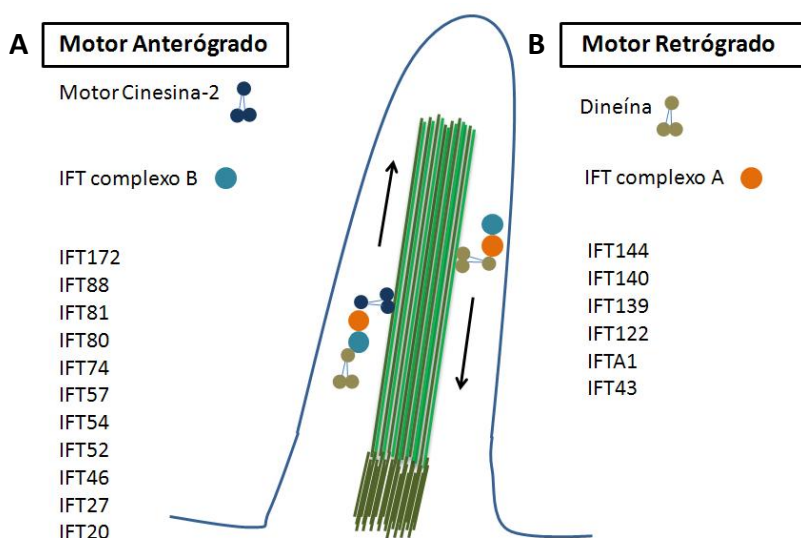


Fig.2 – O motor anterógrado (A), que engloba o complexo B das IFT e o motor cinesina-2 transportam as proteínas *cargo* para a parte mais distal do cílio. O motor retrógrado (B) composto pelo motor de dineína e pelo complexo A das IFT faz o transporte na direcção da base do cílio (baseado em Goetz e Anderson, 2010).

Os genes que codificam para as proteínas IFT são conservados entre os organismos ciliados eucariontes mas, estão ausentes em organismos não ciliados como as plantas superiores e fungos (Avidor-Reiss *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004).

1.4– Cílios e via de sinalização Hedgehog (Hh)

A via de sinalização Hh controla uma grande variedade de fenómenos no desenvolvimento dos vertebrados e invertebrados, como a padronização a nível embrionário, a organogénese e ainda a homeostase de vários tecidos (revisto por Christensen *et al.*, 2009). A via Hh começou por ser vastamente estudada em *Drosophila* e uma vez que os componentes desta via são conservados nas diferentes espécies, foi postulado um modelo de transdução de sinal comum para *Drosophila* e vertebrados. De uma forma geral, o ligando da via Hh (que nos vertebrados existem em três formas: Shh, Ihh e Dhh, sendo o primeiro o mais comum) liga-se ao seu receptor membranar na célula receptora, Ptc (Patched), aliviando a sua acção inibidora sobre Smo

(Smoothed), outra proteína transmembranar. Smo é impedido de se ligar à membrana permanecendo em vesículas citoplasmáticas na presença inibitória de Ptc, por meio de um mecanismo desconhecido (revisto por Goetz e Anderson, 2010). Esta informação passa através de um complexo proteico ao qual pertencem proteínas como Cos2/Kif7 (Costal2 na *Drosophila* cujo ortólogo nos vertebrados é Kif7), SuFu (inibidor da via), e os factores de transcrição Ci/Gli (Cubitus Interruptus e Glioma nos vertebrados que podem ser Gli1, 2 e 3) (revisto por Goetz e Anderson, 2010). Quando a via de sinalização está activa o reconhecimento do ligando pelo receptor promove por um lado, a activação dos factores de transcrição Gli (forma activadora GliA) e por outro, impede a sua clivagem proteolítica que levaria à formação da sua forma repressora (GliR) (revisto por Goetz e Anderson, 2010).

A primeira evidência de que os cílios são necessários para a transdução de sinal da via de sinalização Hh em vertebrados foi demonstrada por Huangfu *et al.* (2003). Os autores demonstraram que mutações nos genes que codificam as proteínas IFT172 (também designada de Wimple) e a IFT88 (Tg737 ou Polaris), ambas pertencentes ao complexo B das IFT, originam a perda de neurónios ventrais, um fenótipo semelhante àquele obtido pela perda de sinalização Shh (Sonic Hedgehog). Também em 2003, Zhang e colaboradores estudaram o mutante hipomórfico para *polaris*, Tg737^{orpk} (descrito previamente por Murcia *et al.*, 2000), e avaliaram os problemas morfológicos do esqueleto, verificando defeitos na padronização do crânio, dentes e membros, nomeadamente os membros apresentavam polidactilia preaxial (fusão dos dois dígitos mais anteriores). Todavia, o fenótipo torna-se mais severo quando analisado no mutante nulo para *polaris* (Tg737^{Δ2-3-β-gal}), onde se pode observar uma duplicação dos dígitos em imagem espelho (Zhang *et al.*, 2003). Deste modo, foi verificado que as proteínas IFT, cuja função estava anteriormente associada apenas à ciliogénese, estavam a intervir na via de sinalização Shh, ajuzante ao receptor membranar Ptc1 e amontante aos efectores da via, os factores de transcrição Gli.

Durante a padronização do botão do membro de ratinho, a expressão de *shh* encontra-se restrita à parte posterior, a ZPA (*zone of polarizing activity*), gerando-se um gradiente de Shh que se torna mais fraco anteriormente, o que vai determinar a indentidade dos dígitos (revisto por Johnson e Tabin, 1997). O

fenótipo de duplicação dos dígitos verifica-se quando existe expressão ectópica de *shh* anteriormente (revisto por Johnson e Tabin, 1997). No entanto, o fenótipo de duplicação dos dígitos observado por Zhang *et al* (2003) e mais tarde por Haycraft e colaboradores (2005) no mutante nulo para *polaris* (Tg737^{Δ2-3-β-gal}), revela que *shh* está expresso apenas na ZPA e não apresenta qualquer expressão ectópica anteriormente. Porém, a expressão de *ptc1* e *gli1*, genes alvo da via Hh, é anulada. Este fenótipo, de duplicação dos dígitos em imagem espelho, é semelhante ao observado num mutante Gli3^{-/-} (revisto por Eggenschwiler e Anderson, 2007), no qual os níveis de Shh não ficam restritos à parte posterior, distribuindo-se ao longo do eixo anterior-posterior mimetizando o fenótipo de uma ZPA ectópica. No mutante *polaris* verificou-se que existia uma alteração no processamento proteolítico de Gli, com um aumento da forma activadora de Gli3 comparativamente ao controlo, o que determina o fenótipo de duplicação dos dígitos (Haycraft *et al.*, 2005).

De facto, na ausência de proteínas IFT, não só o processamento proteolítico de Gli não ocorre correctamente, como a própria activação da forma *full-length* de Gli está também inibida (Huangfu *et al.*, 2003). Estudos feitos a nível dos neurónios ventrais do tubo neural de ratinho demonstram que

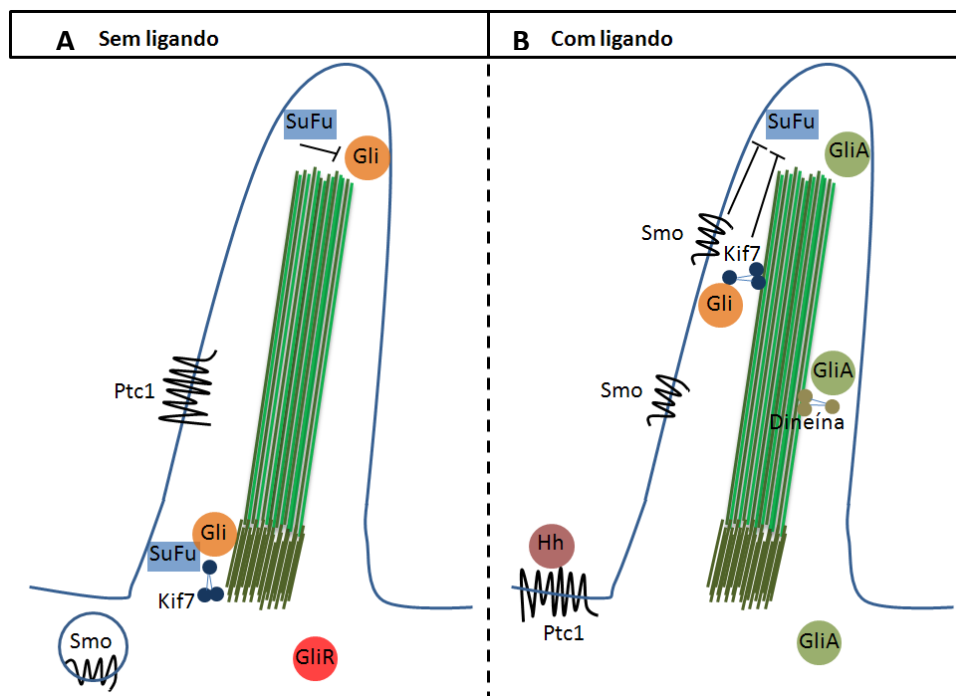


Fig.3 – Modelo proposto para a transdução de sinal da via de sinalização Hh através do cílio, em vertebrados. Sem a presença de ligando (A) a via está inibida. Na presença de ligando (B), Hh liga ao receptor Ptc1, que possibilita a entrada de Smo na membrana do cílio (baseado em Goetz e Anderson, 2010).

na ausência de IFT, os genes alvo de Gli2A não são activados (Huangfu *et al.*, 2003).

A proteína Polaris, sendo uma IFT, localiza-se no cílio, mas verificou-se que componentes da via Hh também se encontram neste. As proteínas Gli *full-length* e Sufu, localizam-se na parte distal do cílio, assim como Polaris, enquanto GliR se encontra apenas no núcleo, sugerindo que a clivagem de Gli *full-length* e passagem a GliR poderá ocorrer no cílio, havendo posterior internalização para o núcleo (Haycraft *et al.*, 2005). Outros estudos de genética e bioquímica demonstraram ainda que outros componentes da via Hh estão localizados no cílio, designadamente Ptc1, Ptc2 e Smo que apresentam uma translocação para o cílio dependente da sinalização Hh (Rohatgi *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009).

Assim sendo, em vertebrados, Ptc1 localiza-se na membrana ciliar, na base do cílio, inibindo a ligação de Smo à membrana e a sua posterior entrada no cílio, através de um mecanismo desconhecido (Fig.3A). Na presença do ligando, Ptc1 é translocado para a membrana plasmática e Smo desloca-se para a membrana ciliar (Fig.3B). Na parte distal do cílio, Smo antagoniza SuFu activando a via e levando à translocação da forma *full-length* de Gli para o cílio (revisto por Andersen e Goetz, 2010).

1.5– O mutante *iguana*

O gene *iguana* (*igu*) codifica a proteína Dzip1, uma proteína *zinc finger* com domínios *coiled-coil* essenciais à transdução de sinal da via Hh em peixe-zebra (Sekimizu *et al.*, 2004; Wolff *et al.*, 2004). O mutante *iguana* foi primeiramente analisado e associado à via de sinalização Hh devido ao seu fenótipo de corpo curvado e mal-formações dos sómitos e neurónios ventrais do tubo neural, semelhante ao do mutante *sonic you* (*syu*) (Brand *et al.*, 1996; Odenthal *et al.*, 2000). Mais tarde, foi demonstrado que, de acordo com outros mutantes da via Hh, o mutante *iguana* apresenta uma expressão reduzida dos genes alvo da via Hh na parte ventral do tubo neural de embriões de peixe-zebra, mas contrariamente ao que se esperava, a nível dos sómitos, o domínio de expressão dos genes alvos da via encontra-se expandido e não reduzido (Sekimizu *et al.*, 2004). Estes resultados revelaram-se muito intrigantes,

principalmente quando se verificou que a activação dos genes alvo da via Hh, era independente do ligando Hh nos embriões mutantes para *igu*, uma vez que o tratamento com ciclopamina, inibidor de Smo, não conduz à perda dos domínios de expressão de genes alvo (designadamente de *ptc1*), o que se verifica nos embriões *wild type* (wt). Para além disso, a sobre-expressão de *shh* não afecta o fenótipo nem a expressão dos genes alvo no mutante *igu*, quer seja nos sómitos ou no tubo neural. Estes resultados apontam para a possibilidade de existir uma via de activação paralela dos genes alvo da via Hh nos embriões mutantes para *igu*, uma vez que a inibição de GliA, ou um aumento da expressão de GliR leva à perda da expressão dos genes alvo da via Hh nos embriões mutantes para *igu* (Sekimizu *et al.*, 2004). Concluiu-se assim que a proteína Igu/Dzip1 é um componente da via Hh que actua ajuante de Smo e amontante aos factores de transcrição Gli, actuando na modulação destes (Sekimizu *et al.*, 2004; Wolff *et al.*, 2004).

Mais recentemente, foi descoberto que a proteína Igu/Dzip1 é importante para a ciliogénese, designadamente para a formação do axonema (Glazer *et al.*, 2010; Tay *et al.*, 2010). A proteína Igu/Dzip1 foi detectada essencialmente no citoplasma (Wolff *et al.*, 2004), e a sua sub-localização verificou-se ser a nível do corpo basal dos cílios, co-localizando-se com a marcação para γ -tubulina (um marcador de corpo basal) (Glazer *et al.*, 2010; Tay *et al.*, 2010). Em peixe-zebra, o mutante *iguana* perde completamente os cílios primários, tendo sido proposto que o fenótipo observado em mutantes *igu* relativamente à perda de sinalização da via Hh se deve ao facto de se perderem os cílios, necessários à transdução de sinal da via Hh, e não de uma forma directa envolvendo Igu como componente desta via (Glazer *et al.*, 2010; Tay *et al.*, 2010).

1.6– Diversidade entre espécies

Os componentes da via Hh são conservados em invertebrados e vertebrados. No entanto, uma vez que nos invertebrados a ciliogénese só ocorre em determinados tipos celulares especializados, o papel dos cílios para a transdução de sinal da via Hh parece ser uma característica apenas partilhada entre os vertebrados.

A associação da proteína Igu à ciliogénese foi demonstrada em peixe-zebra (Glazer *et al.*, 2010; Tay *et al.*, 2010). Na ausência de Igu o cílio primário não se forma (Glazer *et al.*, 2010; Tay *et al.*, 2010) e ocorre uma transdução de sinal da via Hh alterada (Odenthal *et al.*, 2000; Sekimizu *et al.*, 2004; Wolff *et al.*, 2004). Contudo, a associação da proteína Igu à ciliogénese não é específica dos vertebrados, tendo sido demonstrada a perda de cílios perante a inibição da proteína Igu também em planária (Rink *et al.*, 2009). Todavia, no caso da planária, a perda de Igu e consequentemente dos cílios primários não afecta a via de sinalização Hh (Rink *et al.*, 2009), verificando-se assim que a presença de cílios em planária não é necessária para a transdução de sinal da via Hh. Em planária, proteínas como Fu (Fused) e Kif27 (homólogo de Cos2/Kif7), são necessárias apenas para a ciliogénese e não fazem parte dos componentes da via Hh neste organismo (Rink *et al.*, 2009). Contudo, em vertebrados, verifica-se o oposto: Fu e Kif7/Kif27/Cos2 são componentes da via Hh e não desempenham qualquer papel na ciliogénese.

No caso da *Drosophila*, um organismo que não apresenta cílios (excepto nas células germinais e sensoriais) as mesmas proteínas Fu e Cos2/Kif27/Kif7 que na planária desempenham um papel apenas na ciliogénese, neste organismo desempenham um papel apenas na transdução de sinal da via Hh.

Em peixe-zebra, Fu, Kif7/Kif27/Cos2, Igu e os próprios cílios são necessários para a transdução de sinal da via Hh. Em relação ao papel de Igu em mamíferos, não foi ainda estabelecido, mas tanto a presença de Kif7/Cos2 como dos cílios são necessários à sinalização desta via (revisto por Huangfu e Anderson, 2006).

De acordo com estes resultados, a necessidade da presença de cílios em vertebrados para a transdução de sinal da via Hh não é partilhada com *Drosophila* e planária. No entanto, a planária usa proteínas para a sua ciliogénese cujos homólogos são componentes da via de sinalização Hh na *Drosophila* e nos vertebrados, sendo que nestes organismos estas proteínas não estão implicadas na ciliogénese.

2 – Regeneração

Os cílios são organelos necessários à manutenção da homeostase e reparação de diversos tecidos. Esta função está relacionada com a sua capacidade de transdução de sinal de diversas vias de sinalização. Durante a regeneração, as vias FGF (Fibroblast Growth factor), Hh e Wnt actuam de forma interligada para conduzir o processo regenerativo. Deste modo, é importante averiguar a possível função dos cílios na integração destes sinais durante a regeneração epimórfica.

O conceito geral de regeneração refere-se à capacidade que um organismo tem de voltar a formar uma estrutura que tenha sido amputada ou danificada por doença. Entre os vertebrados, os mamíferos apresentam uma reduzida capacidade regenerativa, ao contrário de répteis, peixes e anfíbios que manifestam esta aptidão de voltar a formar estruturas ou órgãos danificados, sendo os últimos os grupos com maior capacidade regenerativa (revisto por Stoick-Cooper *et al.*, 2007).

O peixe-zebra tem sido um dos organismos modelo em estudos de regeneração pela sua capacidade de regenerar as barbatanas, o coração, a espinal medula, o nervo óptico e as escamas (revisto por Poss *et al.*, 2003). Numa perspectiva clássica, o conceito de regeneração esteve geralmente associado à regeneração de estruturas amputadas de organismos adultos, no entanto, mais recentemente, as larvas de vários organismos têm sido usadas como modelo de estudo de processos regenerativos, é o caso de larvas de peixe-zebra (Mathew *et al.*, 2009) e as larvas de *Xenopus* (Tazaki *et al.*, 2005).

2.1 – Tipos de Regeneração

Normalmente, quando nos referimos ao termo regeneração estamos a incluir diferentes processos com diferentes complexidades no mesmo conceito, como reparação tecidular ou mecanismos homeostáticos.

De uma forma geral, o termo regeneração é frequentemente associado à regeneração epimórfica. Este processo ocorre através da formação de um blastema, isto é, um *pool* de células progenitoras que surgem por baixo do epitélio regenerativo (ou de ferida) e que têm a informação morfogenética

necessária para dar origem à estrutura amputada. Para além deste fenómeno regenerativo complexo que requer informação posicional e direccional existem ainda mais dois processos também associados ao conceito de regeneração: reparação tecidual e crescimento compensatório. A regeneração ou reparação tecidual é o processo pelo qual um órgão consegue reparar um determinado tecido quando este é ligeiramente danificado, como por exemplo a reparação do músculo-esquelético, ou a constante regeneração da pele. O crescimento compensatório é o processo pelo qual após amputação parcial de um órgão, a restante estrutura desse órgão cresce de modo a compensar a perda da zona amputada; é o caso da regeneração que ocorre a nível do fígado (revisto por Stoick-Cooper *et al.*, 2007).

2.2- Processos da Regeneração Epimórfica

O uso da barbatana caudal de peixe-zebra adulto como modelo de regeneração é bastante comum no estudo dos mecanismos moleculares que regulam este fenómeno. Não só é simples aceder à estrutura que queremos amputar, como a barbatana apresenta uma estrutura muito organizada e relativamente simples de ossos segmentados dispostos em raios (*lepidotrichia*) em que cada osso é formado por dois hemi-raios côncavos. A barbatana caudal, após amputação, tem a capacidade de regenerar em duas semanas. O processo de regeneração epimórfica ocorre através da sequência de vários acontecimentos: o fecho da ferida, a formação do blastema, e o crescimento regenerativo da estrutura amputada (*outgrowth*) (Fig.4).

O fecho da ferida tem início imediatamente após a realização da amputação, 1 a 3hpa (horas pós amputação) com a formação do epitélio

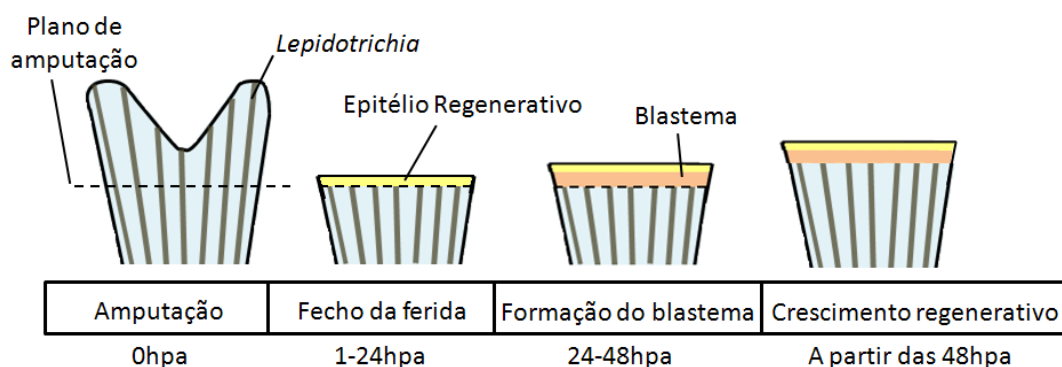


Fig.4 – Estádios do processo regenerativo epimórfico na barbatana caudal de peixe-zebra.

regenerativo que se vai tornar mais espesso até às 12-18hpa (revisto por Stoick-Cooper *et al.*, 2007). Este processo ocorre unicamente através da migração de células da epiderme que vão recobrir a zona amputada, sendo que o epitélio se torna mais espesso devido à disposição de várias camadas de células que provêm da contínua migração de células (12-18hpa) (Santamaria *et al.*, 1996, Poleo *et al.*, 2001; Nechiporuk e Keating, 2002). Entre as 18 e as 24hpa o epitélio regenerativo vai proliferar tornando-se mais denso e compacto, dando origem à AEC (*apical epidermal cap*) (revisto por Poss *et al.*, 2003). Estas células vão apresentar grande quantidade de β -catenina, molécula transmembranar importante para uma melhor adesão célula-célula, sendo este um dos primeiros marcadores do processo de regeneração (Poss *et al.*, 2000). Durante este primeiro passo da regeneração existem moléculas e vias de sinalização essenciais para a formação ou especificação deste epitélio regenerativo. A via de sinalização Wnt/ β -catenina é uma delas. A injeção de adenovírus contendo Dkk1 (Dickkopf1), um antagonista de Wnt e portanto inibidor da via, na barbatana caudal do peixe-zebra após amputação impede a formação do epitélio da ferida e consequentemente o processo de regeneração (Kawakami *et al.*, 2006). A ligação do antagonista Dkk1 aos receptores da via Wnt vai impedir a translocação da β -catenina citoplasmática (molécula efectora da via) para o núcleo bloqueando a via. Contudo, quando adenovírus com β -catenina constitutivamente activa é injectado, ocorre a recuperação do fenótipo observado e forma-se o epitélio regenerativo (Kawakami *et al.*, 2006).

Uma outra molécula essencial para os primeiros eventos da regeneração é o Fgf20, pertencente à via de sinalização FGF. Este gene foi descoberto através de um *screen* mutagénico realizado com o objectivo de descobrir genes necessários ao início da regeneração (Whitehead *et al.*, 2005). A expressão de *fgf20* está inicialmente presente na fronteira epitélio-mesênquima e com a formação do blastema co-localiza-se com a expressão do gene *msxb*, marcador de blastema. O mutante designado de *dob* (*devoid of blastema*) apresenta um bloqueio na regeneração a partir dos 2dpa (dias pós-amputação), forma um epitélio regenerativo anómalo e não consegue formar blastema (Whitehead *et al.*, 2005).

Depois do fecho da ferida e da formação da AEC começa a formar-se o blastema a partir das 24hpa (24 horas pós-amputação). O blastema é a

estrutura cujas células progenitoras e proliferativas vão dar origem aos diferentes tecidos da estrutura amputada. Através de marcadores fluorescentes e da incorporação de BrdU (*bromodeoxyuridine*), células que se encontram numa zona mais proximal relativamente ao plano de amputação vão migrar na direcção do local amputado. Por debaixo do epitélio regenerativo, estas células vão-se reorganizar e adquirir um elevado potencial proliferativo dando-se a formação do blastema (Poleo *et al.*, 2001; Nechiporuk e Keating, 2002; Santos-Ruiz *et al.*, 2002). No entanto, continua por perceber qual o mecanismo pelo qual este *pool* de células adquirem este potencial proliferativo, sendo a desdiferenciação celular e a activação de células estaminais quiescentes, dois possíveis processos (revisto por Poss *et al.*, 2003).

A via de sinalização Wnt/ β -catenina desempenha também um papel importante na formação do blastema. Foi demonstrado que quando a via Wnt/ β -catenina é bloqueada após a formação do epitélio da ferida, a expressão do gene *msxb* e a formação de blastema são inibidos, havendo um bloqueio na regeneração.

Uma outra via de sinalização implicada na formação do blastema é a via FGF. Quando os peixes são cortados e colocados num meio com o inibidor de Fgfr1 (Fibroblast Growth Factor Receptor 1), SU5402, a formação do blastema é afectada, enquanto o epitélio da ferida se forma correctamente apresentando a expressão de β -catenina característica deste tecido (Poss *et al.*, 2000).

Estas duas vias de sinalização são essenciais tanto na formação do epitélio regenerativo como mais tarde no crescimento do blastema.

Outra via essencial durante o processo regenerativo da barbatana caudal é a via de sinalização Hh. Esta via é necessária para que se dê o crescimento regenerativo. Este crescimento que ocorre após o programa de regeneração estar instalado designa o crescimento da estrutura amputada de modo a recuperar a sua forma e tamanho normal. Este processo ocorre depois da maturação do blastema que finaliza entre os 2-4dpa (revisto por Poss *et al.*, 2003).

Aos 2dpa a expressão de *shh* está restrita a um domínio a nível da camada basal da epiderme de forma adjacente a cada raio que está a formar, enquanto aos 3dpa é visível a presença da expressão de *shh* em dois domínios distintos. A expressão de *ptc1*, por sua vez, apresenta um domínio mais

expandido que engloba a zona dos dois domínios de *shh*. Quando, aos 2dpa os peixes são tratados com ciclopamina, uma droga que inibe a via de sinalização Hh através da inibição de Ptc1, verifica-se que aos 3dpa a expressão de *shh* fica restrita a um só domínio e expandida para a zona do blastema, enquanto a expressão de *ptc1* é completamente inibida, havendo uma disposição ectópica de osso na parte mais distal da barbatana (Quint *et al.*, 2002). O tratamento com ciclopamina gera ainda uma redução da proliferação celular e consequente bloqueio da regeneração (Quint *et al.*, 2002). Por outro lado, a expressão ectópica de *shh* a nível do blastema origina um excesso de deposição de osso e consequente alteração da padronização da barbatana caudal (Quint *et al.*, 2002). Estes estudos concluem que a via de sinalização Shh está de alguma forma implicada na proliferação e/ou diferenciação dos escleroblastos, células que produzem o osso, que se encontram no blastema maduro.

A mesma perda de proliferação e de deposição da matriz óssea verificam-se quando existe expressão ectópica de *bmp2* no blastema. Este efeito é revertido quando a barbatana caudal é tratada com *Chordin*, um inibidor de BMP (Bone Morphogenetic Proteins) (Quint *et al.*, 2002). Outros estudos revelam um papel da via de sinalização BMP como sendo necessária na proliferação celular de células do blastema e na deposição da matriz óssea pelos escleroblastos (Smith *et al.*, 2006).

2.3- Regeneração da barbatana caudal – adulto *versus* larva

O uso das larvas de peixe-zebra como modelo de estudo de regeneração surgiu recentemente. Em 2004, Kawakami e colaboradores demonstraram que tal como a barbatana caudal do adulto, a barbatana caudal da larva, também regenera (Fig.5). Esta barbatana caudal apresenta uma estrutura mais simples do que a do adulto e é constituída pela notocorda e pela *fin fold*, sendo a *fin fold* a parte amputada nas experiências (Fig.5A). A *fin fold* é uma estrutura muito fina constituída apenas por epitélio e mesênquima e é sustentada pela presença de *actinotrichias*, fibras de colagénio e elastoidina. A barbatana caudal adulta começa a formar-se a partir dos 10dpf (dias pós-fertilização) com a formação dos ossos, *lepidotrichia*, sendo que três semanas

após a fertilização, a barbatana já apresenta a morfologia adulta e está completamente enervada e vascularizada.

A *fin fold* da larva tem um tempo de regeneração de três dias, após os quais já se assemelha a uma *fin fold* com a mesma idade não amputada. Tal como se verifica no organismo adulto, a *fin fold* manifesta a formação de um epitélio regenerativo e um *pool* de células proliferativas que formam o blastema. Foi demonstrado através da técnica de hibridação *in situ* que a expressão de genes marcadores de blastema (*msxc*, *msxe*) e de epitélio regenerativo (*dlx4*) estão presentes na *fin fold* amputada (Kawakami *et al.*, 2004). Apesar da simplicidade estrutural da *fin fold*, sucedem os mesmos acontecimentos regenerativos de outras estruturas com capacidade de regeneração epimórfica, e para além disso, apresenta também as mesmas vias de sinalização a actuar nos mesmos processos regenerativos.

Foi demonstrado, através do uso de uma linha transgénica negativa dominante, induzida por um choque térmico que inibe a sinalização Wnt/ β -

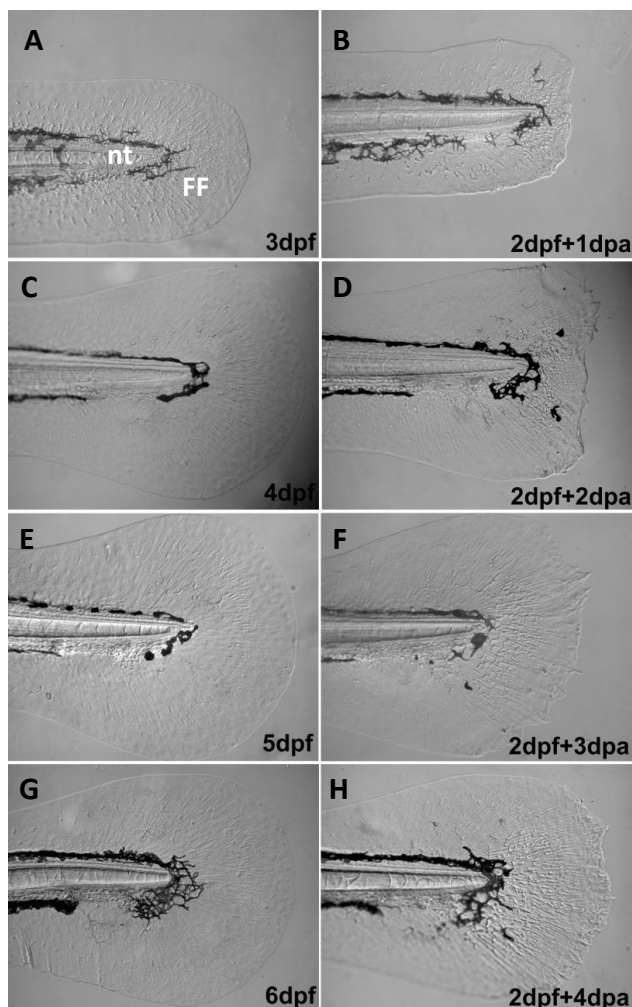


Fig.5 – Estádios do processo regenerativo da *fin fold* de larvas de peixe-zebra (DIC) (B, D, F e H), com o respectivo controlo não amputado (A, C, E e G); nt: notocorda; FF: *fin fold*.

catenina, que tal como no adulto, a perda desta sinalização durante a regeneração das larvas, conduz à perda de formação do epitélio da ferida e consequentemente do blastema, bloqueando o processo regenerativo (Mathew *et al.*, 2009). A via de sinalização FGF está também implicada na regeneração da *fin fold* das larvas. Quando, após a amputação, são tratadas com SU5402, um químico inibidor da via, a larva consegue formar o epitélio regenerativo mas não forma o blastema, havendo bloqueio da regeneração a partir desse ponto (Kawakami *et al.*, 2004).

Estes resultados demonstram que apesar de a larva apresentar uma barbatana caudal com uma estrutura muito diferente da do adulto, mais simples e ainda um tecido “embrionário”, no sentido em que está a ocorrer crescimento quando se fazem as experiências de regeneração; a verdade é que o processo regenerativo da barbatana do adulto vai apresentar exactamente os mesmos mecanismos de regeneração no que diz respeito às vias de sinalização que actuam nos mesmos pontos do processo regenerativo e à mesma sequência de eventos. Os resultados de um *microarray* realizado em tecidos da *fin fold* das larvas com 1dpa, quando comparado com um *microarray* feito na barbatana caudal de um peixe adulto (1, 3 e 5dpa), demonstram que existem 341 transcritos em comum (sobre ou sob-expressos), em que 64% deles apresentam uma semelhança no padrão de regulação génica entre os dois tecidos regenerativos (Mathew *et al.*, 2009). Para além disso, Mathew e colaboradores (2009), demonstraram ainda que o gene *fgf20*, fundamental durante a regeneração da barbatana caudal do adulto, está também sobre-expresso durante a regeneração da *fin fold*, não sendo no entanto detectável através da técnica hibridação *in situ*.

Deste modo, estes estudos demonstram que existem muitas similaridades entre a regeneração da *fin fold* e da barbatana caudal do adulto. Assim, a larva é um bom modelo de estudo de regeneração, que tem vantagens em relação ao adulto pelo facto de podermos ter acesso a um maior número experimental e devido à maior facilidade de manuseamento no uso de drogas e em ensaios moleculares.

Os cílios primários são organelos com um papel importante na homeostase de vários tecidos. Esta função dos cílios está associada à capacidade de transdução de sinal de diversas vias de sinalização. Através do uso da técnica de imunohistoquímica usando o anticorpo anti- α -tubulina acetilada, verificámos que a *fin fold* de larvas de peixe-zebra apresenta cílios. Neste trabalho pretendemos averiguar qual o papel dos cílios durante a regeneração epimórfica. As vias de sinalização FGF, Wnt e Hh desempenham um papel fundamental durante a regeneração da barbatana caudal de peixe-zebra adulto. Foi demonstrado que a *fin fold* das larvas deste organismo também regenera e que, tal como no adulto, necessita da activação de vias de sinalização como a de Wnt e FGF. No entanto, em larvas, nada está descrito em relação à via de sinalização Hh. Tendo sido demonstrado que em vertebrados a transdução de sinal da via de sinalização Hh ocorre através dos cílios primários, pretendemos verificar qual a relação entre cílios e a via Hh durante a regeneração de larvas de peixe-zebra.

Assim, tivemos como objectivos gerais deste projecto:

- Caracterizar o tamanho e o número de cílios numa barbatana caudal sem ser amputada *versus* amputada ao longo do tempo;
- Caracterizar o fenótipo resultante da abolição de cílios primários neste sistema regenerativo;
- Averiguar se a via de sinalização Hh é necessária para a regeneração da barbatana caudal das larvas de peixe-zebra;
- Perceber se existe uma relação entre os cílios da barbatana caudal e a via Hh na regeneração da barbatana caudal das larvas.

1 – Manutenção e manipulação das larvas de peixe-zebra

Os ovos foram recolhidos e colocados em caixas de *petri* com meio embrionário, numa estufa a 28,5°C. As caixas eram limpas e trocadas regularmente.

As larvas foram amputadas sempre aos dois dias pós-fertilização (dpf). Foram anestesiadas em Tricaine 4mM em meio embrionário e a barbatana caudal amputada cirurgicamente com um bisturi. A amputação é feita imediatamente a seguir à parte mais distal da notocorda (Fig.6). Depois de cortadas, as larvas ficavam a regenerar em meio embrionário ou em meio tratado com químicos, em caixas de *petri* numa estufa a 28,5°C.

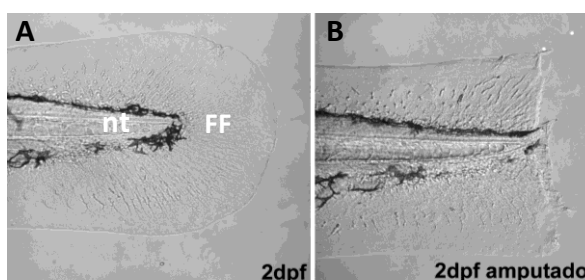


Fig.6 – Amputação da *fin fold* das larvas de peixe-zebra (DIC). Larva com 2dpf antes da amputação (A). Larva com 2dpf imediatamente a seguir à amputação (B); nt: notocorda, FF: *fin fold*.

1.2 – O mutante *iguana*

O gene *iguana* codifica a proteína DZIP1, uma proteína que se localiza no corpo basal dos cílios, sendo que os embriões mutantes para *iguana* não possuem cílios primários. O mutante *iguana* utilizado neste trabalho possui o alelo tm79a que apresenta uma mutação pontual que afecta o gene *iguana* (Brand *et al.*, 1996). Os peixes adultos são mantidos em heterozigotia, uma vez que o mutante não sobrevive até à idade adulta.

1.1 – Químicos:

1.1.1 – Ciclopamina

A ciclopamina inibe a proteína transmembranar Smo inactivando a via de sinalização Hh (Incardona *et al.*, 1998). A ciclopamina (cat:C4116, Sigma-

Aldrich) foi diluída em DMSO (*dimethyl sulfoxide*) para uma concentração *stock* de 12mM. As concentrações experimentais usadas foram de 100µM, 150µM e 200µM, com diluição em meio embrionário.

1.1.2 – BrdU (*Bromodeoxyuridine*)

Através da incorporação de BrdU durante a fase S do ciclo celular foi possível detectar o nível de proliferação celular nos diferentes tratamentos. Para tal, as larvas foram tratadas com 2mM BrdU em meio embrionário durante 6h. O BrdU (cat:B5002, Sigma-Aldrich) foi diluído em PBS 1x com NaOH 7mM para uma concentração *stock* de 10mg/ml. De seguida, as larvas são fixadas e segue-se o protocolo de imunohistoquímica para detecção do BrdU.

1.1.3 – PTU, *1-phenyl-2-thiourea*

Com o objectivo de obter uma melhor visualização dos resultados da revelação na hibridação *in situ*, as larvas foram submetidas a um inibidor da síntese de melanina (PTU), a partir do 1dpf, que é quando começa a surgir a melanização. A partir da solução *stock* a 25x de PTU, esta era diluída em meio embrionário a 0,003%.

2 – Sondas de RNA

As sondas que foram utilizadas na hibridação *in situ* são sondas de mRNA. Estas são construídas através da adição de digoxigenina à solução para a transcrição da sonda. Assim, a digoxigenina vai conjugar com o nucleótido uridina que vai ser incorporado na síntese de mRNA. Desta forma, através do uso de anticorpos anti-DIG conjugados com marcadores é possível visualizar a presença de mRNA nos diferentes tecidos. As sondas utilizadas neste projecto foram: *shh* (cedida pelo laboratório de Keneth Poss), *ptc1* (cedida pelo laboratório de Jeffrey Gross) e *msxc* (cedida pelo laboratório de Henry Roehl)

3 – Hibridação *In Situ* - whole mount

As larvas foram fixadas durante a noite a 4°C com paraformaldeído 4% (PFA) em tampão fosfato (PBS). Depois foram lavadas várias vezes em PBT (PBS, 0,1%Tween 20) e desidratadas com soluções progressivas de maior concentração de metanol em PBS (MeOH 25%, MeOH 50%, MeOH 75%) até atingir os 100% de metanol, solução na qual as larvas são guardadas a -20°C. O protocolo de hibridação *in situ* foi realizado tendo por base Thisse e Thisse (1998).

PBS 10x (1L):

NaCl 80g

KCl 2g

Na₂HPO₄ 26,8g

KH₂PO₄ 2,4g

Perfazer com água destilada

Ajustar pH=7,4 com HCl

Protocolo Thisse e Thisse, 1998

Dia 1

- 1- As larvas são re-hidratadas em soluções progressivamente menos concentradas em metanol:
MeOH 75%, PBS, 5min
MeOH 50%, PBS, 5min
MeOH 25%, PBS, 5min
100% PBT, 4x 5min
- 2- Digerir com Proteinase K (10µg/ml) em PBT
2dpf – 25min
3dpf – 35 min
4dpf – 40 min
- 3- Re-fixar em PFA 4%, 20min
- 4- Lavar em PBT 5x 5min
- 5- Colocar as larvas na solução de pré-hibridação (*HybMix*) 2-5hrs a 70°C
HybMix (HM):
Formamida

SSC 20x

Tween20 0,1%

Ácido Cítrico 1M pH=6

Heparina 50µg/ml,

Em água destilada

- 6- Remover solução de pré-hibridação e colocar a sonda. Deixar a hibridação ocorrer durante a noite a 70°C.

Dia 2

- 1- Recuperar a sonda
- 2- Lavagem rápida em 100% HM a 70°C
- 3- Lavar em 75%HM, 25% SSC 2x a 70°C, 15min
- 4- Lavar em 50%HM, 50% SSC 2x a 70°C, 15min
- 5- Lavar em 25%HM, 75% SSC 2x a 70°C, 15min
- 6- Lavar em SSC 2x a 70°C, 15min
- 7- Lavar 2x 30min em SSC 0,2x
- 8- Lavar em 75% SSC 0,2x, PBT, 10min
- 9- Lavar em 50% SSC 0,2x, PBT, 10min
- 10-Lavar em 25% SSC 0,2x, PBT, 10min
- 11-Lavar em 75% SSC 0,2x, PBT, 10min

SSC 20x (500ml):

NaCl 87,65g

Citrato de Sódio 44,1g

Perfazer com água destilada

Ajustar pH=7,0 com HCl

- 12-Lavar em PBT, 10min

- 13-Incubar várias horas com solução de bloqueio:

2% Soro de cabra

2mg/ml BSA (*albumin from bovine serum*)

Em PBT

- 14-Incubar durante a noite a 4°C com anticorpo anti-DIG (anti-digoxigenina)
1:5000 em solução de bloqueio

Dia 3

- 1- Lavagem rápida em PBT
- 2- Lavar em PBT, 6x 15min
- 3- Colocar o tampão de revelação (NTMT), 3x 5min
NTMT:
100mM Tris HCl pH=9,5
50mM MgCl₂
100mM NaCl
0,1% Tween20,
Em água destilada
- 4- Incubar com solução de revelação:
NBT 50mg/ml
BCIP 50mg/ml,
Em NTMT
- 5- Parar a reacção com várias lavagens de PBT
- 6- Pós-fixar com PFA 4%, 5min
- 7- Lavar em PBT várias vezes
- 8- Guardar em Glicerol 70%

4 – Imunohistoquímica

As larvas foram fixadas em PFA 4% em PBS durante a noite, a 4°C. Depois, lavadas em PBT várias vezes e guardadas em PBS a 4°C, excepto aquelas destinadas à detecção de BrdU que foram desidratadas em soluções progressivas de maior concentração de metanol e guardadas a -20°C.

4.1 – Protocolo de imunohistoquímica para a detecção de cílios:

Dia 1

- 1- Lavar em PBSX 2x, 5min
PBSX:
250µl Triton X-100 10%
Em 50ml PBS 1x
- 2- Lavar 1x em água destilada

- 3- Incubar em acetona -20°C, 7min
- 4- Bloquear com PBDX + soro de cabra (15µl por ml) por 1h
PBDX (50ml):
PBS 2x, 25ml
BSA, 0,5g
DMSO, 500µl
Triton X-100 10%, 250µl
Em água destilada
- 5- Adicionar o anticorpo primário diluído em PBDX com soro de cabra, durante a noite a 4°C

Dia 2

- 1- Lavar em PBDX 4x, 30min
- 2- Adicionar o anticorpo secundário diluído em PBDX + soro de cabra, por 1h
- 3- Lavar em PBDX 2x, 10min
- 4- Lavar em PBS 1x, 30min
- 5- Pós-fixar em PFA 4%, 5min
- 6- Lavar em PBS 1x, 2x, 5min
- 7- Incubar com DAPI, 5min
- 8- Lavar em PBS 1x, 3x, 5min
- 9- Guardar em *mowiol*, meio de montagem que permite manter a fluorescência durante mais tempo.

4.2 – Protocolo de imunohistoquímica para detecção de proliferação:

Dia 1

- 1- Re-hidratar através de lavagens em soluções progressivas de:
MeOH 75%, PBST
MeOH 50%, PBST
MeOH 25%, PBST
- 2- Tratamento com Proteinase K (10µg/ml) em PBST, 5min
PBST:
0,1% Triton X-100
Em PBS 1x

- 3- Lavar várias vezes em PBST
- 4- Re-fixar em PFA 4%, 20min
- 5- Lavar várias vezes em água destilada
- 6- Lavar em 2N HCl, 0,1% Triton X-100, 2x, 5min
- 7- Incubar com 2N HCl, 0,1% Triton X-100 a 37°C, 1h
- 8- Lavar em PBST 2x, 5min
- 9- Bloquear com solução de bloqueio (5% de soro de cabra em PBST), 1h
- 10- Incubar com anti-BrdU diluído em solução de bloqueio, durante a noite a 4°C

Dia 2

- 1- Lavar em PBST 2x, 5min
- 2- Lavar em PBST, 1h
- 3- Incubar com anticorpo secundário diluído em solução de bloqueio, 2h
- 4- Lavar por 2h com 5-6 lavagens em PBST
- 5- Guardar em *mowiol*

4.3 – Anticorpos:

Para a detecção de cílios através da técnica de imunohistoquímica foi usado o anticorpo monoclonal *anti-acetylated tubulin* (cat:T7451, Sigma-Aldrich), com a diluição de 1:400. A visualização de corpos basais foi feita utilizando o anticorpo γ -tubulina, cedido pelo laboratório da Dra Helena Soares. A detecção de proliferação celular foi feita utilizando o anticorpo monoclonal *anti-bromodeoxyuridine* (BrdU) (cat:B2521, Sigma-Aldrich), com a diluição de 1:100. Os anticorpos secundários usados foram o Alexa 488 e o Alexa 594 (Invitrogen), com uma diluição de 1:500.

5 – Aquisição e análise de imagem

As larvas sujeitas ao protocolo de hibridação *in situ* foram fotografadas utilizando uma lupa Leica Z6 APO e uma câmera Leica DFC 490. Para maior definição, as barbatanas caudais foram fotografadas usando um microscópio Leica DMR e uma câmera Leica DC 500. As fotografias de DIC foram tiradas utilizando um microscópio Leica DM 5000B e uma câmera Leica DC 350F.

5.1 – Medição da área regenerada das barbatanas caudais das larvas:

As barbatanas caudais foram fotografadas todas à mesma ampliação, utilizando uma lupa Leica MZ10F e uma câmara Evolution MP 5.0. As medições das áreas regeneradas foram feitas utilizando o programa ImageJ, fazendo uma recta perpendicular à zona mais distal da notocorda, que corresponderia ao local da amputação, e delineando toda a barbatana caudal, medindo a sua área. A calibração foi feita com uma fotografia de uma grátícula com a mesma ampliação.

Uma vez que as larvas mutantes para *iguana* são mais pequenas do que o controlo, foi necessário normalizar os resultados das medições da área regenerada da *fin fold*. Para tal, efectuámos um rácio entre a média das áreas regeneradas da *fin fold* e a média das áreas da *fin fold* de larvas não amputadas, para o controlo e o mutante *iguana*. Os dados obtidos foram utilizados na análise estatística. Apesar de não se verificarem diferenças entre o tamanho das larvas tratadas com ciclopamina e das larvas controlo, o mesmo processo foi realizado para a obtenção de resultados mais apurados.

5.2 – Contagem dos cílios:

As imagens de confocal foram adquiridas utilizando um microscópio Zeiss LMS 510 META. As larvas foram montadas em lâminas e a barbatana caudal colocada de modo a ficar totalmente na imagem, sendo que foram retiradas pilhas de imagens ao longo do eixo Z cobrindo toda a espessura da barbatana enquanto era visível a presença de cílios. A distância entre cada imagem da pilha Z adquirida no confocal foi de 0,8µm, que correspondia a metade da espessura da fatia óptica (sobre-amostragem com critério de “Nyquist”). Os cílios foram medidos utilizando o programa LSM Image Browser e quantificados avançando através da pilha Z e contando o número de cílios utilizando o programa ImageJ com o *plug-in Cell Counter* (distribuído gratuitamente na página do ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)).

5.3– Contagem dos núcleos:

Para determinar a densidade celular nas barbatanas caudais nos diferentes pontos no tempo do processo de regeneração, contamos o número de núcleos marcados com DAPI para uma mesma área das barbatanas caudais, utilizando o programa ImageJ com o *plug-in Cell Counter*. O mesmo *plug-in* foi utilizado para contar o número de células positivas para a incorporação de BrdU. Esta contagem foi feita apenas a nível da *fin fold*.

6 – Estatística

Para fazer a análise estatística, as médias foram comparadas usando um teste t de Student bilateral. Foram utilizadas para a análise as médias resultantes das medições para o controlo e o experimental. Os resultados são considerados significativos quando $p < 0,05$. Toda a análise foi feita utilizando o programa Excel (Microsoft Office 2007).

1 – A amputação da *fin fold* promove ciliogénese

A *fin fold* das larvas de peixe-zebra começa a formar-se e a expandir-se a partir do primeiro dia pós-fertilização (1dpf), sendo que aos 2dpf a *fin fold* já é bem visível (Fig.7A). A evidência de que existem cílios na barbatana peitoral de peixe-zebra aos 2dpf (Pascoal *et al.*, comunicação pessoal) fez-nos

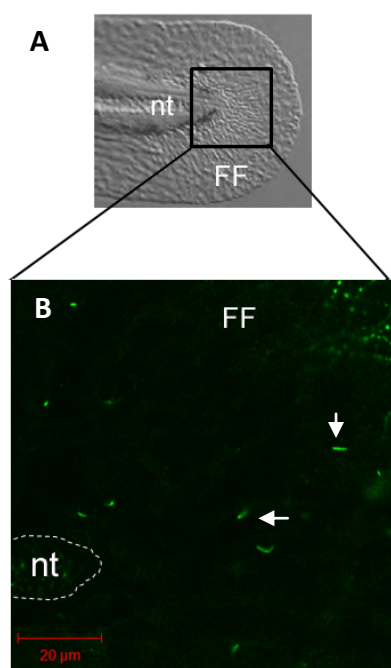


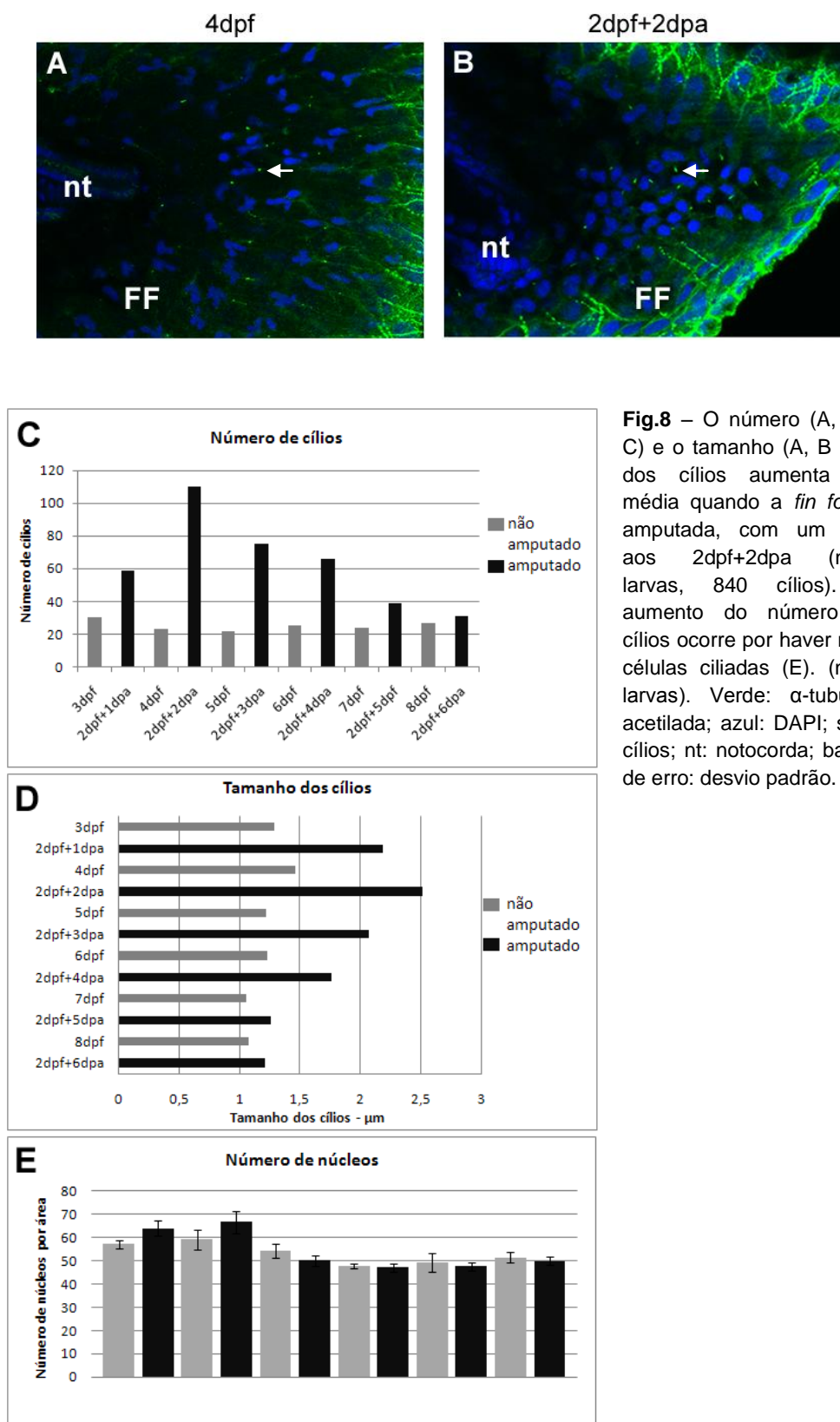
Fig.7 – A barbatana caudal das larvas aos 2dpf (A). A *fin fold* tem cílios (B). Verde: α -tubulina acetilada; seta: cílios; nt: notocorda; FF: Fin fold; escala = 20 μ m.

questionar se a nível da barbatana caudal existiriam também cílios. Deste modo, através do uso da técnica de imunohistoquímica, usando o anticorpo anti- α -tubulina acetilada, identificámos a presença de cílios a nível da *fin fold* de larvas de peixe-zebra (Fig.7B). Aos 2dpf o número de cílios é em média 34 ($\pm 7,63$, desvio padrão) (em toda a *fin fold*) e apresentam um comprimento médio de 2,09 μ m ($\pm 0,308$, desvio padrão) (n=7 larvas, 70 cílios). A partir deste estágio de desenvolvimento o tamanho dos cílios é apenas de 1 μ m-1,5 μ m e o número varia entre 20 e 30 até aos 8dpf (último estágio de desenvolvimento analisado) (Fig.8 C e D) (n=84 larvas, 840 cílios). Foi confirmado que os cílios presentes na barbatana peitoral dos embriões de peixe-zebra são cílios primários

através de imagens de microscopia electrónica em que se observam cortes transversais dos cílios (Pascoal *et al.*, comunicação pessoal). Em relação aos cílios da *fin fold*, apesar de não terem ainda sido obtidos resultados de microscopia electrónica, a sua presença individual em cada célula e o seu tamanho reduzido, aparentam características de cílios primários.

Esta descoberta esteve na base do projecto elaborado durante esta tese, uma vez que, um dos objectivos gerais foi perceber se os cílios são afectados quando amputamos a *fin fold* e se são de alguma forma relevantes para o processo de regeneração. Para tal, realizámos o protocolo de

imunohistoquímica em larvas com diferentes tempos de regeneração, desde 2dpf+1dpa até 2dpf+6dpa, ou seja, larvas amputadas aos 2dpf que foram deixadas a regenerar entre 1 e 6 dias. O respectivo controlo do ponto temporal da regeneração dos 2dpf+1dpa são as larvas não amputadas com 3dpf e assim sucessivamente. Verificámos que existe um grande aumento no tamanho e número dos cílios presentes na *fin fold*, atingindo um pico aos 2dpf+2dpa, e havendo um declínio progressivo a partir desse ponto (Fig.8 A, B, C e D). O número médio de cílios presentes na *fin fold* não amputada aumenta para 60 aos 2dpf+1dpa e para 110 ($\pm 22,74$, desvio padrão) aos 2dpf+2dpa (Fig.8C). Em relação ao tamanho dos cílios, existe também um aumento cujo máximo se verifica aos 2dpf+2dpa e é em média de $2,52\mu\text{m}$ ($\pm 0,295$, desvio padrão) (Fig.8D). Aos 2dpf+6dpa, as larvas amputadas atingem um estado basal no que diz respeito ao número e tamanho dos cílios, sendo semelhante a uma larva não amputada com 8dpf (Fig.8 C e D). Através da análise dos resultados da imunohistoquímica e da marcação dos núcleos com DAPI fomos averiguar se esta alteração no número de cílios não se verifica apenas pelo facto de termos mais células na *fin fold* quando esta é amputada em comparação com uma *fin fold* não amputada. Contudo, o que podemos concluir é que entre os 2dpf+2dpa e os 2dpf+3dpa observámos um ligeiro aumento, não significativo ($p < 0,05$), do número de núcleos por área em relação à barbatana não amputada (Fig.8E) ($n=36$ larvas). Esta pequena diferença não explicará o aumento do número médio de cílios de 30, na barbatana não amputada para 110, na barbatana amputada (Fig.8 C, D e E). Assim, verificámos que após a amputação da *fin fold* das larvas de peixe zebra ocorre um grande aumento do número de cílios, com um pico aos 2dpf+2dpa (Fig.8 A, B e C). Esse aumento acontece pelo facto de termos um maior número de células a formarem o cílio, do que teríamos numa condição de não amputação.



2 – O processo regenerativo na ausência de cílios

Com o aumento do tamanho e do número de cílios na *fin fold* após amputação, resolvemos averiguar se a presença dos cílios é necessária para a regeneração. Para isso, analisámos o processo regenerativo no mutante *iguana*, no qual não existem cílios primários. Os embriões mutantes para o gene *iguana* foram obtidos após cruzamento de peixes adultos *iguana* heterozigóticos. A identificação dos embriões mutantes para *iguana* foi feita aos 2dpf, quando é visível a característica curvatura do tronco que se torna mais acentuada ao longo do desenvolvimento (Fig.9B). Os embriões heterozigóticos

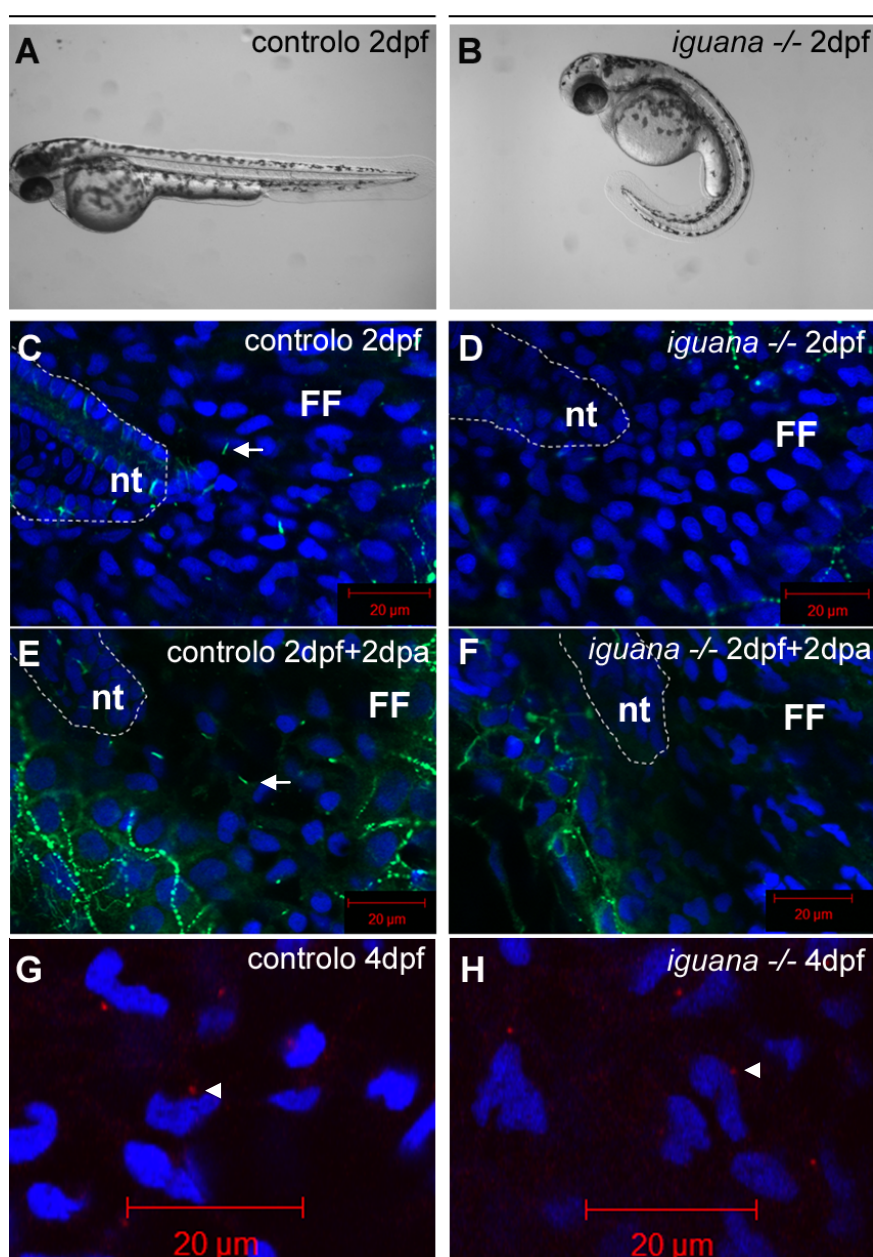


Fig.9 – As larvas mutantes para *iguana* aos 2dpf apresentam uma curvatura do tronco (B) inexistente no controle (A). Quer aos 2dpf, quer aos 2dpf+2dpa, as larvas mutantes para *iguana* não possuem cílios a nível da *fin fold* (D e F), ao contrário do controle (C e E). Apesar de não possuírem cílios, os corpos basais estão presentes no mutante *iguana*. Verde: α -tubulina acetilada; azul: DAPI; vermelho: γ -tubulina; nt: notocorda; FF: *fin fold*; seta: cílios; triângulo: corpo basal; escala = 20 μ m.

e wt da mesma postura, que não apresentam este fenótipo (Fig.9A), foram utilizados como controlo. Conforme o que estava previamente descrito sobre este mutante, relativamente à ausência completa de cílios primários, confirmámos que estas larvas não apresentam cílios a nível da *fin fold*. Este resultado foi obtido através do uso da técnica de imunohistoquímica com o anticorpo anti- α -tubulina em larvas mutantes para *iguana* quer aos 2dpf, quer aos 2dpf+2dpa, ponto temporal na regeneração que corresponde ao pico de cílios (Fig.9 C, D, E e F). No entanto, após uma imunohistoquímica com o anticorpo anti- γ -tubulina verificámos que os corpos basais continuam presentes nestes mutantes (Fig.9 G e H). Aos 2dpf+2dpa as larvas mutantes para *iguana*

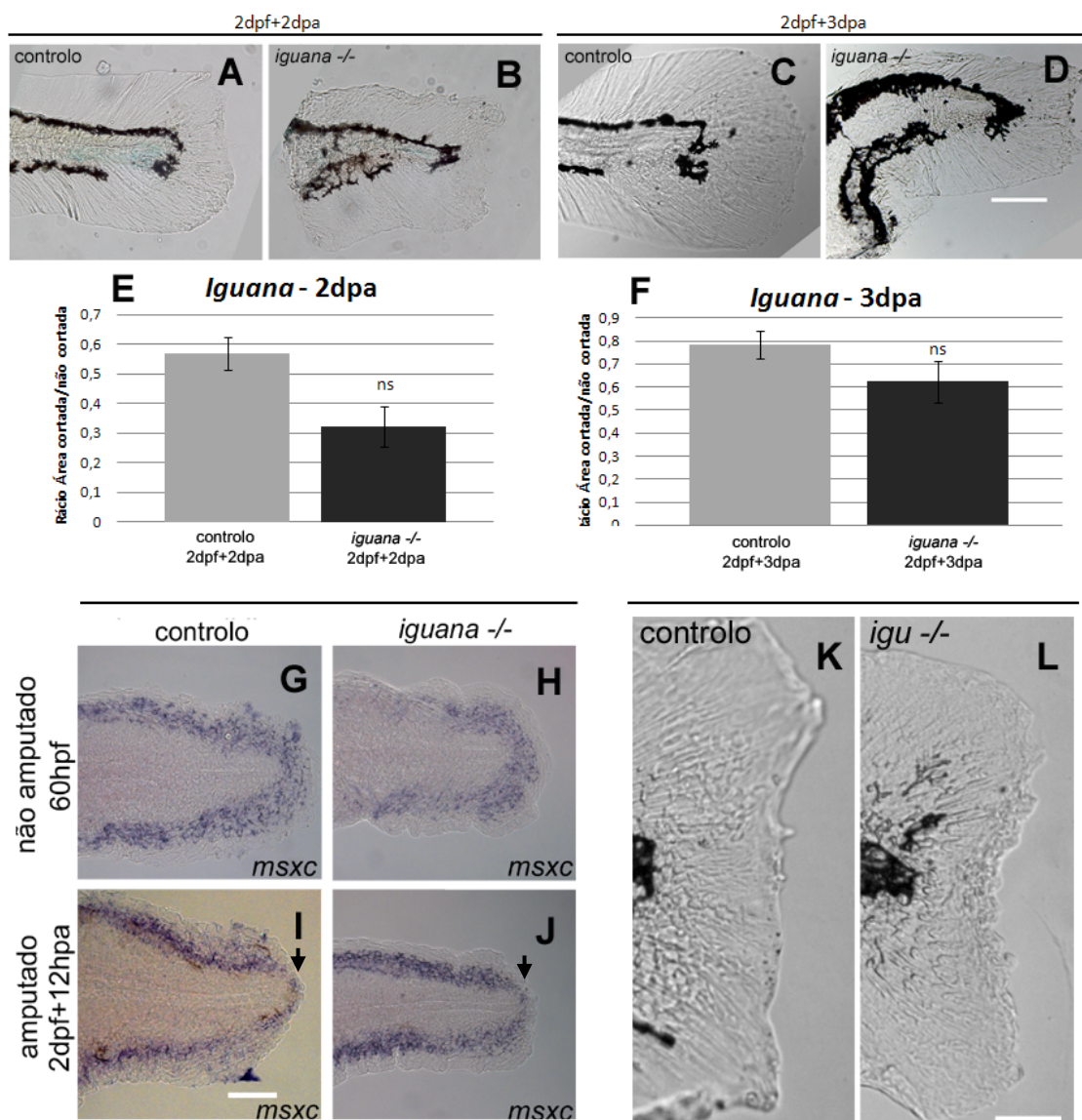


Fig.10 – As larvas mutantes para *iguana* apresentam um atraso no processo regenerativo (A, B, C, D, E e F), acompanhado por uma aglomeração de células na parte distal da *fin fold* aos 2dpf+2dpa (2dpf+2dpa - *iguana*: n=27, controlo: n=20; 2dpf+3dpa - *iguana*: n=20, controlo: n=21) (K e L). A formação do blastema não é afectada nas larvas mutantes (hibridação *in situ* com *msxc*, marcador de blastema) (G, H, I e J). Seta: blastema; *=p<0,05; barras de erro: desvio padrão; escala=50 μ m.

(*iguana*: n=27, controlo: n=20) apresentam uma aglomeração de tecido na parte mais distal da *fin fold* (Fig.10 K e L) e uma diferença na área regenerada acentuada relativamente ao controlo (Fig.10 A, B e E). Esta diferença torna-se mais reduzida entre os 2dpf+2dpa e os 2dpf+3dpa (Fig.10 C, D e F) (*iguana*: n=20, controlo: n=21), sendo que aos 2dpf+4dpa apresentam a *fin fold* totalmente regenerada (Fig.11 C e D). Uma vez que as larvas mutantes para *iguana* são mais pequenas do que as larvas controlo, esta diferença entre as áreas regeneradas foi feita tendo em conta o rácio entre a área regenerada e a área de uma *fin fold* não amputada com o mesmo tempo de desenvolvimento para normalizar os resultados, para o controlo e para a experiência (*iguana*). Apesar de o processo regenerativo não ser bloqueado, estas diferenças nas áreas regeneradas sugerem que a ausência de *iguana* leva a um atraso na regeneração. Deste modo, pretendemos confirmar se os primeiros passos da regeneração e a formação do blastema são afectados. Para isso, fizemos uma hibridação *in situ* utilizando a sonda *msxc*, cujo gene é expresso nas células que formam o blastema. O *msxc* é normalmente um gene marcador de mesênquima indiferenciado, e portanto é expresso na *fin fold* com um padrão de expressão salteado. Contudo, depois de amputada, a *fin fold* perde a expressão deste gene, que reaparece aos 2dpf+12hpa imediatamente por baixo do epitélio de ferida (Kawakami *et al.*, 2004). As larvas mutantes para *iguana* formam blastema no mesmo tempo de regeneração que o controlo (Fig.10 G, H, I e J), demonstrando que o atraso na regeneração começa a ocorrer durante o crescimento regenerativo e não durante a formação do blastema.

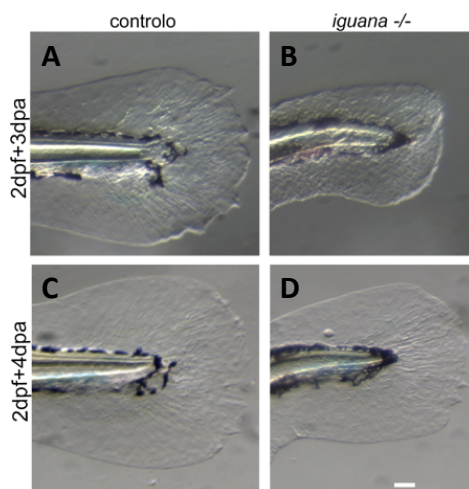


Fig.11 – As larvas mutantes para *iguana* apresentam um atraso durante a regeneração (A versus B). No entanto, conseguem completar esse processo (C e D). Escala=50µm.

Com estes resultados, verificámos que apesar de termos um aumento do número de cílios a nível da *fin fold* das larvas de peixe-zebra quando amputada, a ausência completa de cílios primários não inibe a regeneração, mas origina um atraso no processo regenerativo, que acaba por se completar mais tarde (2dpf+4dpa) do que nas larvas controlo (2dpf+3dpa) (Fig.11).

3 – Regeneração na ausência de sinalização Hh

Tendo em conta que os cílios primários são necessários para a correcta transdução de sinal da via de sinalização Hh e estando esta via implicada no crescimento da barbatana caudal do peixe-zebra adulto após amputação (Quint *et al.*, 2002), pretendemos averiguar se a regeneração da *fin fold* da

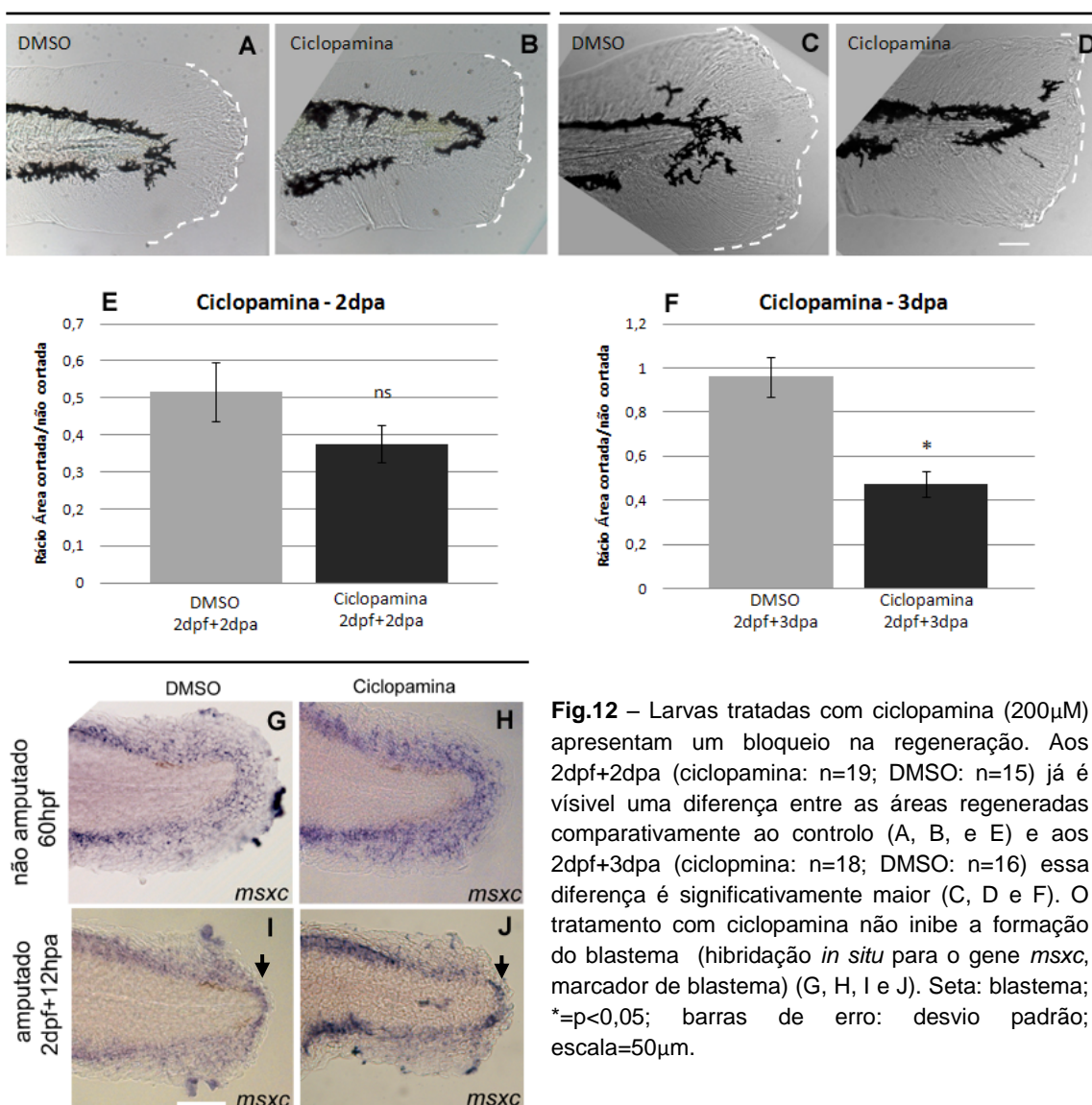


Fig.12 – Larvas tratadas com ciclopamina (200µM) apresentam um bloqueio na regeneração. Aos 2dpf+2dpa (ciclopamina: n=19; DMSO: n=15) já é visível uma diferença entre as áreas regeneradas comparativamente ao controlo (A, B, e E) e aos 2dpf+3dpa (ciclopamina: n=18; DMSO: n=16) essa diferença é significativamente maior (C, D e F). O tratamento com ciclopamina não inibe a formação do blastema (hibridação *in situ* para o gene *msxc*, marcador de blastema) (G, H, I e J). Seta: blastema; *=p<0,05; barras de erro: desvio padrão; escala=50µm.

larva de peixe-zebra é afectada quando inibimos a sinalização Hh. Para tal, utilizámos o inibidor da via Hh, ciclopamina, que inibe a acção da proteína transmembranar Smo. Nesta experiência cortámos a *fin fold* das larvas, e deixámo-las a regenerar no meio embrionário com ciclopamina a uma concentração de 200 μ M (de acordo com Hadzhiev *et al.*, 2007). Aos 2dpf+2dpa (ciclopamina: n=19; DMSO: n=15; p>0,05) verificámos nas larvas tratadas com ciclopamina, a mesma tendência observada nas larvas mutantes para *iguana* no que diz respeito à menor área regenerada comparativamente ao controlo, neste caso larvas deixadas a regenerar num meio embrionário com DMSO (Fig.12 A, B e E).

Aos 2dpf+3dpa, a área regenerada da *fin fold* das larvas tratadas com ciclopamina é significativamente menor do que as larvas tratadas com DMSO (ciclopamina: n=18; DMSO: n=16; p<0,05) que apresentam uma *fin fold* regenerada, demonstrando que ocorreu um bloqueio na regeneração das larvas tratadas com o inibidor da via Hh (Fig.12 C, D e F). Uma vez que este bloqueio só se verifica entre os 2 e os 3 dias pós amputação, seria de esperar que os primeiros processos regenerativos tenham ocorrido correctamente. Para confirmar se a formação do blastema não está afectada e que apenas o crescimento é bloqueado nas larvas tratadas com ciclopamina fizemos uma hibridação *in situ* com a sonda *msxc*. Tal como nas larvas mutantes para *iguana*, larvas tratadas com ciclopamina apresentam expressão de *msxc* na zona correspondente ao blastema aos 2dpf+12hpa, demonstrando que a formação deste não é afectada (Fig.12 G, H, I e J).

Estes resultados demonstram que a via de sinalização Hh desempenha um papel importante na regeneração da *fin fold*. Uma vez que durante a regeneração também ocorre o crescimento normal da larva, pretendemos averiguar se o tratamento com ciclopamina estaria também a inibir o crescimento normal da *fin fold*. A área da *fin fold* não cortada de larvas tratadas com ciclopamina e DMSO aos 4dpf e aos 5 dpf foram analisadas. Verificámos que não existem diferenças significativas a nível de crescimento da *fin fold* entre as larvas tratadas com ciclopamina e com DMSO nestes dois períodos de tempo (4dpf - ciclopamina: n=12; DMSO: n=10 p>0,05; 5dpf – ciclopamina: N=9, DMSO: N=8, p>0,05). Assim, reforçamos os resultados obtidos durante a

regeneração que comprovam o bloqueio regenerativo verificado nas larvas tratadas com ciclopamina.

As larvas tratadas com ciclopamina apresentam um bloqueio no crescimento regenerativo tal como se verifica no adulto (Quint *et al.*, 2002). Para além desta observação, verificámos também que nas larvas tratadas com ciclopamina a parte mais distal da notocorda apresenta uma acumulação de melanóforos (células pigmentadas com melanina). Estes resultados são consistentes com os resultados obtidos no peixe adulto que demonstram que existe uma acumulação de melanóforos na parte mais distal da barbatana caudal que apresenta um bloqueio na regeneração (Quint *et al.*, 2002).

A administração de ciclopamina não afecta o tamanho médio (ciclopamina: 1,80µm, n=5 larvas, 50cílios; DMSO: 1,83µm, n=4 larvas, 40 cílios) ou o número de cílios observados aos 2dpf+2dpa (ciclopamina: 53 cílios, n=4 larvas; DMSO: 55 cílios, n=5 larvas; em média o mesmo número de cílios para a mesma área).

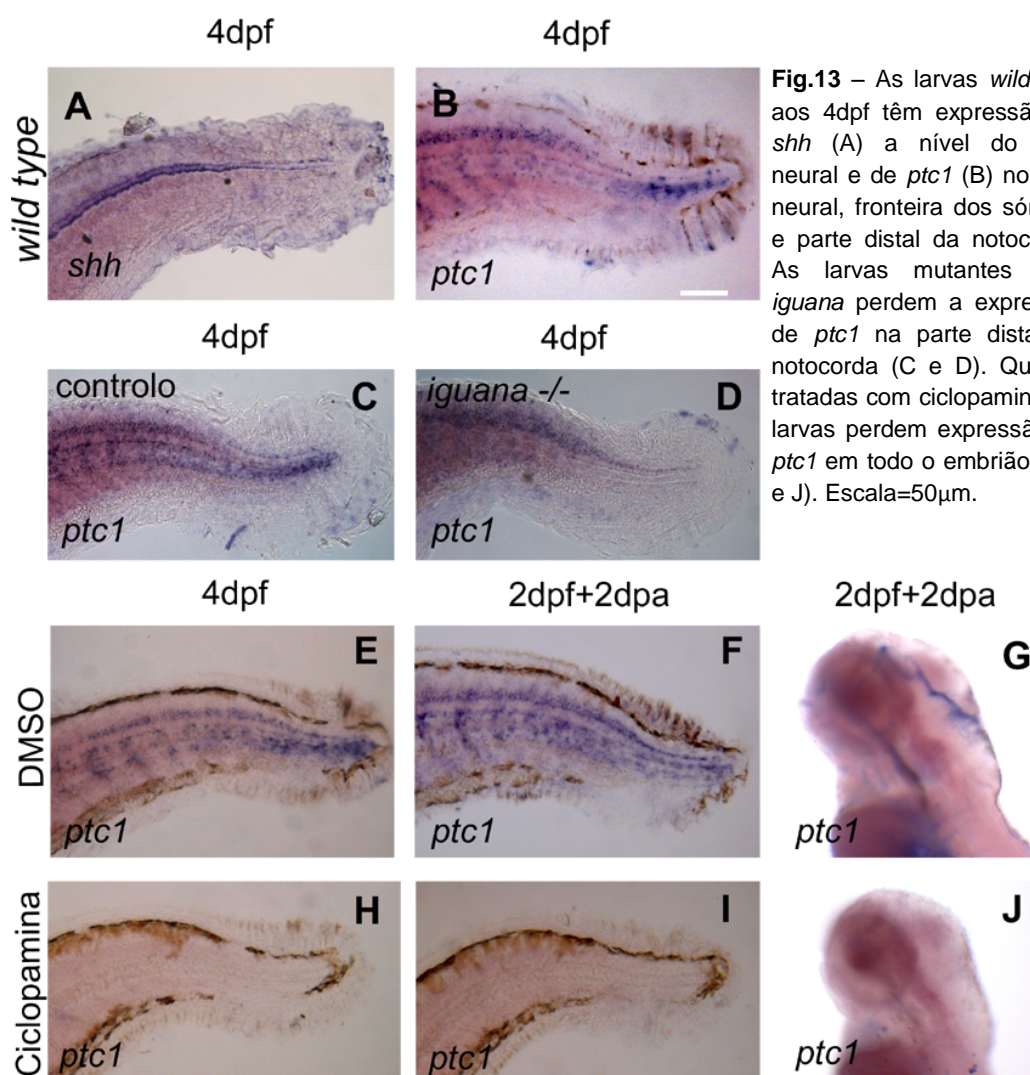
4 – Modulação da via de sinalização Hh durante a regeneração

A via de sinalização Hh é necessária para a regeneração da *fin fold* de larvas de peixe-zebra. Desta forma, pretendemos averiguar a existência de uma fonte de *shh* a nível da barbatana caudal, e de um dos genes alvo da via de sinalização Hh, *ptc1*, que evidencia que a via está activa. Aos 4dpf a expressão de *shh* é detectável a nível do tubo neural (Fig.13A), no entanto, a nível da barbatana caudal não há expressão de *shh*. Em contraste, *ptc1* (Fig.13B) parece estar expresso na parte mais distal da notocorda aos 4dpf. Esta expressão de *ptc1*, restrita àquela zona da notocorda é consistente nas diferentes larvas. Podemos também identificar a expressão de *ptc1* no tubo neural e na fronteira entre os sómitos. Para posterior confirmação dos domínios de expressão de *ptc1* é necessário a realização de cortes histológicos.

De forma a analisar a expressão de *ptc1* quando ciclopamina (200µM) é adicionada ao meio embrionário, realizámos uma hibridação *in situ* com a sonda *ptc1*, nas larvas tratadas com ciclopamina (Fig.13 H, I e J) e nos respectivos controlos tratados com DMSO (Fig.13 E, F e G), aos 4dpf e aos

2dpf+2dpa. De acordo com o descrito por Quint e colaboradores (2002) no peixe adulto, verificámos que ao tratar as larvas com ciclopamina obtivemos a perda completa da expressão de *ptc1*, o que demonstra que a via de sinalização Hh está inactiva.

As larvas mutantes para *iguana* apresentam um atraso no processo regenerativo, mas conseguem completá-lo. Pretendemos estudar se a expressão de *ptc1* é anulada, assim como nas larvas tratadas com ciclopamina. O que verificámos é que a expressão de *ptc1* nas larvas mutantes é inibida a nível da parte mais distal da notocorda, estando apenas presente no tubo neural e nos sómitos (Fig.13 C e D). Nestas larvas, a via Hh não é completamente inibida, embora esteja afectada na parte distal da notocorda, encontra-se activa no tubo neural e sómitos. Estes resultados demonstram que o mutante *igu* é um mutante que apresenta uma desregulação na modulação da via Hh.



5 – As larvas mutantes para *iguana* revelam a existência de regeneração sem proliferação celular

A regeneração da *fin fold* de larvas de peixe-zebra é acompanhada de proliferação celular (Kawakami *et al.*, 2004). Entre as 6 e as 12hpa a proliferação celular ocorre essencialmente na parte mais distal da *fin fold*, junto do local da amputação; ao 1dpa a proliferação ocorre uniformemente pela *fin fold* e aos 2dpa a proliferação celular ocorre numa zona mais próxima da notocorda (Kawakami *et al.*, 2004). No caso da *fin fold* não amputada, entre os 2dpf e os 5dpf, o nível de proliferação celular é praticamente nulo na *fin fold*, sendo que a proliferação celular nesta zona só ocorre após amputação (Kawakami *et al.*, 2004). Existe ainda uma zona com elevada proliferação celular na parte ventral da notocorda que corresponde ao *pool* de células que vai dar origem à barbatana caudal do adulto, as ACFP (*adult caudal fin primordia*). Esta zona não manifesta alterações a nível proliferativo entre uma *fin fold* amputada e não amputada (Kawakami *et al.*, 2004). Foi ainda descrito que este *pool* de células e o desenvolvimento da *fin fold* adulta é regulado pela via de sinalização Hh (Hadzhiev *et al.*, 2007).

Quando o peixe adulto é tratado com ciclopamina, verifica-se um bloqueio na regeneração acompanhado por uma redução na proliferação celular (Quint *et al.*, 2002). Deste modo, pretendemos analisar a proliferação celular nas larvas de peixe-zebra tratadas com ciclopamina durante a regeneração. Uma vez que é entre os 2dpf+2dpa e os 2dpf+3dpa que ocorre o bloqueio regenerativo, as larvas foram tratadas com BrdU aos 2dpf+2dpa durante 6h (de acordo com Kawakami *et al.*, 2004).

As larvas tratadas com DMSO apresentam um padrão de proliferação celular idêntico ao descrito por Kawakami *et al.*, (2004) (Fig.14 A e B). No que diz respeito às larvas tratadas com ciclopamina, verificámos que a proliferação celular a nível da *fin fold* e das ACFP é reduzido quase completamente (Fig.14 C e D). O mesmo resultado é obtido com o marcador de mitoses fosfo-histona H3. Deste modo, o bloqueio da via de sinalização Hh poderá estar a inibir a regeneração devido à ausência de proliferação. A inibição da proliferação celular devido ao tratamento com ciclopamina é dependente da dose (Fig.14J).

Depois da análise destes resultados resolvemos verificar de que forma ocorre a proliferação celular nas larvas mutantes *iguana*. A análise foi feita colocando BrdU no meio embrionário aos 2dpf+2dpa durante 6h e depois foram fixados. Ao fazer a imunohistoquímica para detectar a presença de BrdU verificamos que não existe proliferação celular a nível da *fin fold* das larvas mutantes para *iguana*, quer das amputadas, quer não amputadas. Para além disso, a proliferação a nível das ACFP é igualmente nula (Fig.14 E, F, G e H). Contudo, estas larvas apresentam proliferação celular a nível da cabeça, demonstrando que não têm ausência de proliferação em todo o organismo (Fig.14I).

Estes resultados são consistentes com os obtidos quando tratamos as larvas com ciclopamina, relativamente à perda de proliferação celular. No entanto, as larvas mutantes para *iguana* sem proliferação conseguem

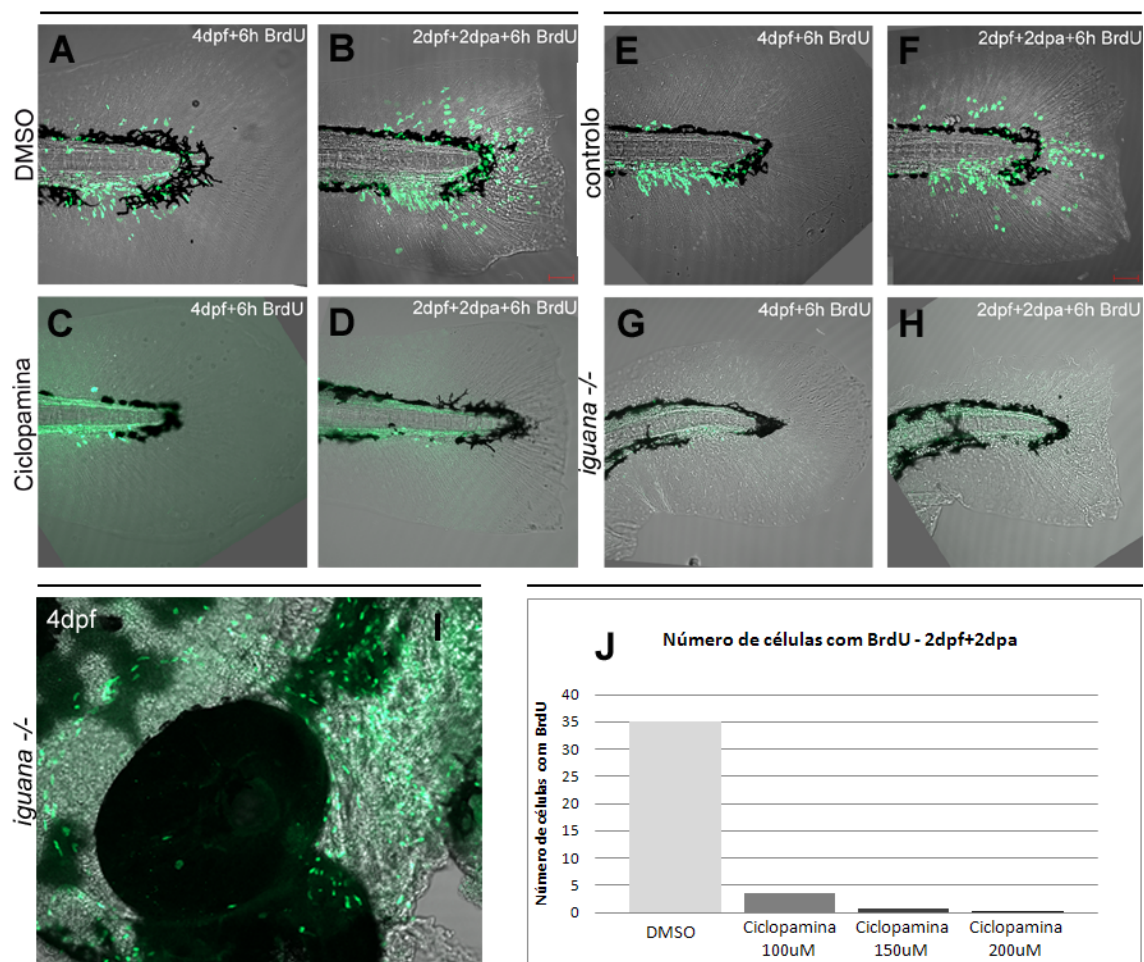


Fig.14 - Quando amputadas, as larvas tratadas com DMSO apresentam proliferação celular na *fin fold* (A, B), assim como as larvas controlo para *iguana* (E, F). As larvas tratadas com ciclopamina (C e D), assim como as larvas mutantes para *iguana* (G, H) não apresentam proliferação celular na *fin fold*. Na cabeça as larvas mutantes apresentam proliferação celular (I); escala = 50µm. Gráfico do número de células com BrdU a nível da *fin fold* em larvas com diferentes concentrações de ciclopamina (J).

regenerar a *fin fold*, sendo que as tratadas com ciclopamina não conseguem concluir o crescimento regenerativo da *fin fold*.

1 – Processo de ciliogénese como resposta a uma lesão

Os nossos resultados demonstram que durante a regeneração da *fin fold* de larvas de peixe-zebra, o número e o tamanho de cílios aumenta após amputação. Este aumento apresenta um pico aos 2dpf+2dpa ao qual se sucede um decréscimo progressivo até se atingir um número e tamanho basais assim que a arquitectura da *fin fold* é reposta. Os cílios primários são necessários à transdução de sinal de diferentes vias de sinalização, dependendo do tipo celular em que se encontram. Assim, o aumento do número e do tamanho dos cílios na *fin fold* de larvas de peixe-zebra durante o processo regenerativo poderá estar relacionado com uma maior susceptibilidade para responder a sinais externos do seu ambiente e permitir um eficaz processo regenerativo.

Estudos recentes demonstram o mesmo tipo de evento ciliogénico em outros contextos tecidulares. O tamanho dos cílios primários renais aumenta durante a reparação epitelial após lesão (Verghese *et al.*, 2008 e 2009). Os cílios dos rins funcionam como sensores de fluxo ao longo do epitélio renal e são necessários para a organização estrutural deste órgão, sendo que a sua ausência ou mal-formação pode gerar a doença dos rins policísticos (PKD) (Nauli e Zhou, 2004). Durante o processo de reparação, induzido por necrose tubular aguda, o tamanho dos cílios aumenta para mais do que o dobro do tamanho inicial, uma semana após ser sido submetida a lesão. Depois desse pico o tamanho dos cílios diminui até atingir o tamanho basal cerca de seis semanas depois da lesão (Verghese *et al.*, 2008 e 2009). Os cílios primários renais dobram-se de acordo com a intensidade de um fluxo imposto, e esta capacidade é essencial à sinalização celular dependente do cálcio (Ca^{2+}) (Schwartz *et al.*, 1997; Praetorius, Spring, 2001; Liu *et al.*, 2003). Foi descrito que o tamanho do cílio primário está correlacionado com uma maior susceptibilidade para se dobrar quando um determinado fluxo é imposto (Schwartz *et al.*, 1997). Este fenómeno sugere que o aumento do tamanho dos cílios renais, após lesão, lhes confere transientemente uma maior capacidade

de resposta a sinais externos (fluxo) permitindo restaurar mais rapidamente a diferenciação epitelial e permitir a aquisição da organização estrutural e da função perdida durante a lesão (Verghese *et al.*, 2009).

A migração celular é um processo muito importante durante o fecho de uma ferida. Em culturas celulares de fibroblastos, os cílios orientam-se paralelamente à zona lesada para dirigir a migração celular na direcção da ferida e assim se dar o seu fecho (Schneider *et al.*, 2010). Na zona da ferida a secreção do PDGF-AA (Platelet-Derived Growth Factor-AA) parece regular a direcção da migração celular possivelmente através dos cílios primários dado que estes apresentam o receptor PDGFR α nas suas membranas celulares (Schneider *et al.*, 2010). Recentemente foi demonstrado que ratinhos mutantes para *polaris* (Tg737^{orpk}) nos quais os cílios primários estão ausentes ou apresentam mal-formações, não completam o fecho de uma ferida na pele durante os 7 dias que os wt demoram a completar este processo (Schneider *et al.*, 2010). Neste estudo, é referido que os ratinhos Tg737^{orpk} não completam o fecho da ferida no mesmo período de tempo que os wt, mas não é referido se estes mutantes conseguem completar esse fecho mais tarde, o que permitiria distinguir se existe um atraso no processo de fecho da ferida ou a incapacidade total de concluir este processo. No caso do mutante *iguana*, em larvas de peixe-zebra, verificámos que a ausência de cílios não bloqueia completamente a regeneração, mas origina um atraso nesse processo. Aos 2dpf+3dpa as larvas wt apresentam uma *fin fold* com uma morfologia semelhante a uma *fin fold* não amputada enquanto nos mutantes *iguana* isso só ocorre aos 2dpf+4dpa.

Num estudo de Boquist (1968) em *hamsters* chineses sobre a regeneração das células β do pâncreas, que ocasionalmente apresentam cílios, verificou-se que o número de cílios aumenta após um tratamento com *alloxan* (droga que destrói as células β). Neste estudo constatou-se que durante a regeneração tecidular havia mais células β com cílios e que por vezes podiam surgir dois cílios numa só célula. De acordo com os resultados, foi sugerido que os cílios poderão ter um papel importante na auto-renovação celular durante a reparação tecidular, o que explicaria o seu aparecimento (Boquist 1968).

Durante a regeneração da *fin fold* das larvas de peixe-zebra existem mais células que formam cílios, do que numa condição normal. Embora haja um aumento do número e do tamanho de cílios, um mutante que não tem cílios acaba por regenerar. A presença destes cílios não parece ser essencial para que a regeneração ocorra, mas a sua ausência conduz a um atraso no processo regenerativo. Esta situação é remanescente com o que acontece em planária. Foi descrito pela primeira vez a formação de cílios em células de blastema, durante a regeneração, em planária (Rink *et al.*, 2009). Todavia, a ausência destes cílios não provoca danos no processo regenerativo (Rink *et al.*, 2009).

2 – A sinalização Hh e o processo regenerativo

2.1– A sinalização Hh na regeneração de larvas de peixe-zebra

O papel da via de sinalização Hh foi descrito durante a regeneração epimórfica da barbatana caudal de peixe-zebra (Quint *et al.*, 2002). Observámos que tal como no indivíduo adulto, as larvas tratadas com ciclopamina apresentam um bloqueio durante a regeneração. Este bloqueio não afecta a formação do epitélio regenerativo ou do blastema, mas sim o crescimento regenerativo. O tratamento com ciclopamina inibe a proliferação celular da *fin fold* das larvas e reduz completamente a acção da via Hh, perdendo-se por completo a expressão do gene alvo da via, *ptc1*. O mesmo processo ocorre na barbatana caudal do adulto (Quint *et al.*, 2002), demonstrando-se que tanto no adulto como na larva, a via de sinalização Hh é necessária para que a regeneração ocorra correctamente. Uma vez que as larvas mutantes para *iguana* conseguem regenerar sem proliferação, a ausência de proliferação observada em larvas tratadas com ciclopamina pode não ser o evento fulcral resultante da inibição da via de sinalização Hh para que ocorra um bloqueio na regeneração. Talvez seja possível existirem outros processos regulados por Hh que estão inibidos com o tratamento com ciclopamina e que sejam essenciais para a regeneração da *fin fold*. Quando a barbatana caudal do adulto é tratada com ciclopamina e há bloqueio na regeneração, não se formam *actinotrichias* (Quint *et al.*, 2002). Sendo estas

fibras um dos componentes estruturais essenciais na formação da *fin fold*, é necessário que se voltem a formar no contexto da regeneração. Seria interessante confirmar se nestas larvas tratadas com ciclopamina as *actinotrichias* se formam correctamente, ou se a sua ausência, como no adulto, poderiam limitar de alguma forma o crescimento regenerativo.

Este e outros estudos (Kawakami *et al.*, 2004; Mathew *et al.*, 2009) demonstraram que apesar de a estrutura da barbatana caudal da larva ser mais simples do que a do adulto, os eventos do processo regenerativo e os centros de sinalização necessários para a formação de uma nova barbatana são semelhantes.

2.2– A sinalização Hh na regeneração do mutante *iguana*

Vários estudos demonstraram que a via de sinalização Hh está alterada nos mutantes *iguana*, podendo observar-se um aumento ou uma diminuição da regulação de genes alvo da via de acordo com os níveis de Hh necessários para especificar os diferentes tecidos (Odenthal *et al.*, 2000; Sekimizu *et al.*, 2004; Wolff *et al.*, 2004). Nas larvas mutantes para *igu* a expressão de *ptc1*, gene alvo da via Hh, está inibida a nível da parte distal da notocorda, mas continua presente no tubo neural e sómitos. Pelo contrário, as larvas tratadas com ciclopamina perdem completamente a expressão de *ptc1*, inibindo a via. De acordo com estes resultados, verificamos que nas larvas mutantes para *igu* a via de sinalização Hh parece estar alterada mas não completamente inibida, o que pode explicar o facto de estas larvas conseguirem regenerar a *fin fold*, apesar de apresentarem um atraso para concluírem esse processo. Pelo contrário, ao tratar as larvas com ciclopamina, inibe-se a via de sinalização Hh gerando um bloqueio na regeneração.

3 – O papel da proliferação celular na regeneração da *fin fold*

Ao analisarmos a proliferação celular no mutante *iguana*, verificámos a ausência de proliferação celular na *fin fold*, quer numa situação de regeneração, quer a nível do crescimento normal. Apesar disso, estas larvas conseguem concluir o processo regenerativo. Estes resultados revelaram-se

intrigantes uma vez que ao tratar larvas wt com ciclopamina, há um decréscimo quase completo da proliferação celular na *fin fold* e bloqueio no crescimento regenerativo. Para além disso, o decréscimo do número de células marcadas com BrdU nas larvas tratadas com ciclopamina é dependente da dose de droga usada. Se a proliferação celular não é necessária para a regeneração da *fin fold* das larvas, então o bloqueio da sinalização Hh pela administração de ciclopamina estará a afectar outros processos dependentes de Hh e que são importantes para a regeneração, para além da proliferação celular.

De acordo com os resultados obtidos pela incorporação de BrdU, nas larvas usadas como controlo observam-se fenómenos de proliferação celular durante a regeneração da *fin fold*. Pelo contrário, nos mutantes *iguana* observa-se ausência de proliferação celular na *fin fold*, embora estes mutantes mantenham a capacidade de regenerar totalmente. Se de facto a *fin fold* consegue regenerar na ausência de proliferação celular talvez outros fenómenos como a movimentação ou re-organização celular possam ser suficiente para explicar a conclusão do processo regenerativo. Durante a regeneração de uma barbatana caudal de um peixe-zebra adulto, estão também presentes estes dois processos celulares: proliferação e movimento (migração) celular (Poleo *et al.*, 2001). Sendo que os primeiros eventos da regeneração, nomeadamente o fecho da ferida, se devem apenas a fenómenos de migração celular (Santamaria *et al.*, 1996, Paleo *et al.*, 2001; Nechiporuk, Keating, 2002; Santos-Ruiz *et al.*, 1996). Nas larvas *iguana* verificamos que existe um atraso no crescimento regenerativo, mas os primeiros eventos ocorrem correctamente (formação do blastema ocorre no mesmo estágio regenerativo que no controlo), demonstrando que eventos que necessitam de movimentação celular não parecem estar afectados.

A *fin fold* de larvas de peixe-zebra não apresenta proliferação celular durante o crescimento normal da barbatana nos primeiros dias de desenvolvimento (Kawakami *et al.*, 2004), no entanto, a *fin fold* cresce. Durante o processo regenerativo, ocorre proliferação celular a nível da *fin fold*, no entanto, um mutante que não prolifera nesta zona (*igu*) consegue regenerar. A proliferação e outros processos celulares são importantes para a regeneração num contexto de uma larva wt, contudo, estes resultados sugerem que na ausência de proliferação celular, mecanismos como a movimentação e a re-

estruturação celular poderão conduzir o processo regenerativo de modo a re-estabelecer a arquitetura e funcionalidade da *fin fold*.

Estudos feitos em fígado de ratinho demonstraram que após amputação de cerca de 70% da massa total deste órgão, a regeneração ocorre essencialmente através de proliferação celular. No entanto, em ratinhos mutantes *Skp2*^{-/-} (uma proteína *F-box* que pertence ao complexo ubiquitina ligase SCF e que sinaliza a proteína p27^{Kip1} para a via de degradação), que apresentam uma acumulação de p27^{Kip1} e consequente perda de proliferação celular, a massa do fígado continua a ser completamente restituída (Minamishima *et al.*, 2002). Neste caso, a regeneração do fígado ocorre essencialmente por aumento do tamanho dos hepatócitos, demonstrando que poderão existir outros processos de reparação do tecido que numa condição de regeneração normal, não teria tanta influência na regeneração. Apesar de neste caso estarmos perante um tipo de regeneração de crescimento compensatório, o caso da regeneração da *fin fold* pode ser semelhante no sentido em que a proliferação e a migração celular contribuam para a regeneração, mas na ausência de proliferação a *fin fold* consiga completar esse processo apenas com migração celular e re-arranjo entre as células. Isto poderia explicar o caso da regeneração sem proliferação dos mutantes *iguana*.

O estudo da incorporação de BrdU foi feito aos 2dpf+2dpa, altura em que existe maior proliferação celular por toda a *fin fold* e ainda aos 2dpf+60hpa com o mesmo resultado de ausência de proliferação, no entanto, outros pontos na regeneração devem ser avaliados.

4 – A relação dos cílios e da sinalização Hh na regeneração da barbatana caudal de larvas de peixe-zebra

A transdução de sinal da via de sinalização Hh em vertebrados necessita da presença de cílios primários (Huangfu *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003), sendo que vários componentes da via se localizam no cílio (Haycraft *et al.*, 2005).

Em planária a sinalização Hh é independente dos cílios. Durante a regeneração em planária a sinalização Hh é essencial para o estabelecimento da padronização anterior-posterior. Contudo, a ausência de cílios não afecta a

padronização da planária durante a regeneração (Rink *et al.*, 2009). Durante a regeneração da *fin fold* de larvas de peixe-zebra a via de sinalização Hh é necessária para se completar o crescimento regenerativo. Porém, a ausência de cílios primários não inibe a regeneração, apresentando apenas um atraso na duração desse processo. Apesar de estarmos perante um organismo vertebrado, esta observação assemelha-se aos resultados obtidos em planária. Para além disso, nestes mutantes, a sinalização Hh parece não estar completamente inibida, o que poderia explicar a ocorrência de regeneração. Apesar de não haver cílios no mutante iguana, o corpo basal continua presente, e os componentes necessários para a transdução de sinal da via de sinalização Hh podem também continuar presentes e isso ser suficiente para garantir a sinalização Hh necessária para o desenrolar do processo regenerativo da *fin fold*.

A barbatana caudal de larvas de peixe-zebra tem capacidade regenerativa, completando esse processo aos 2dpf+3dpa. As mesmas vias de sinalização que operam durante a regeneração da barbatana caudal do organismo adulto desempenham um papel na regeneração da *fin fold* das larvas. Ao estudar o papel da via de sinalização Hh e dos cílios durante a regeneração da *fin fold* das larvas concluímos que:

- Existem cílios primários na *fin fold* da barbatana caudal de larvas de peixe-zebra;
- Durante o processo regenerativo, o número e o tamanho médio dos cílios aumenta, apresentando um pico aos 2dpf+2dpa e um decréscimo posterior até atingir o estado basal, coincidente com a reposição da arquitectura da barbatana caudal;
- O aumento do número de cílios verifica-se pelo facto de haver mais células a possuírem um cílio;
- A via de sinalização Hh, tal como no indivíduo adulto, é necessária para o crescimento regenerativo da barbatana caudal;
- Larvas mutantes *iguana* não apresentam cílios primários na *fin fold* mas conseguem regenerar, apesar de apresentarem um atraso no processo regenerativo relativamente aos *siblings*;
- Nas larvas *iguana* a regeneração da *fin fold* parece ser independente da proliferação celular;
- Os resultados obtidos nas larvas *iguana* e nas larvas tratadas com ciclopamina sugerem que no contexto da regeneração da barbatana caudal do peixe-zebra, a via de sinalização Hh pode estar a actuar independentemente da presença de cílios.

- Aviador-Reiss T, Maer AM, Koundakjian E, Pilyanovsky A, Keil T, *et al.* 2004. Decoding cilia function: defining specialized genes required for compartmentalized cilia biogenesis. *Cell*, 117(4):527-39.
- Boquist L. 1968. Cilia in Normal and Regenerating Islet Tissue. *Zeitschrift für Zellforschung* 89:519-532.
- Brand M, Furutani-Seiki M, Granato M, Haffter P, *et al.* 1996. Mutations affecting development of the midline and general body shape during zebrafish embryogenesis. *Development*, 123:129-142
- Christensen ST, Pedersen LB, Schneider L, Satir P. 2007. Sensory Cilia and Integration of Signal Transduction in Human Health and Disease. *Traffic*, 8:97-109.
- Cole DG, Diener DR, Himmelblau AL, Beech PL, Fuster JC, Rosenbaum JL. 1998. Kinesin-II-dependent Intraflagellar Transport (IFT): IFT Particles Contain Proteins Required for Ciliary Assembly in. *J. Cell Biol.*, 141(4):993-1008.
- Eggenchwiler JT, Anderson KV. 2007. Cilia and developmental signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 23:345-373.
- Glazer AM, Wilkinson AW, Backer CB, Lapan SW. *et al.* 2010. The Zn Finger protein Iguana impacts Hedgehog signaling by promoting ciliogenesis. *Dev Biol*, 337(1):148-156.
- Goetz SC, Anderson KV. 2010. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nature Reviews Genetics*, 11(5):331-344.
- Haycraft CJ, Banizs B, Aydin-Son, Zhang Q, *et al.* 2005. Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genet.* 1:e53.
- Huangfu D, Liu A, Rakeman AS, Murcia NS, Niswander L, Anderson KV. 2003. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature*, 426:83-87.
- Huangfu D, Anderson KV. 2006. Signaling from Smo to Ci/Gli conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates. *Development*, 133(1):3-14.
- Incardona JP, Gaffield W, Kapur RP, Roelink H. 1998. The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development*, 125(18):3553-3562.
- Jensen CG, Poole CA, McGlashan SR, Marko M, Issa ZI. 2004. Ultrastructural, tomographic and confocal imaging of the chondrocyte primary cilium in situ. *Cell Biol. Int.* 28:101-10.
- Johnson RL, Tabin CJ. 1997. Molecular models for vertebrate limb development. *Cell*, 90:979-990.
- Kawakami A., Fukazawa T, Takeda H. 2004. Early fin primordia of zebrafish larvae regenerate by a similar growth control mechanism with adult regeneration. *Dev. Dynamics*, 231:693-699.
- Kawakami Y, Esteban CR, Raya M, Kawakami H, Marti M, Dubova I, Belmonte J. 2006. Wnt/ β -catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration. *Genes Dev.*, 20:000.
- Kim J, Kato M, Beachy PA. 2009. Gli2 trafficking links Hedgehog-dependent activation of Smoothened in the primary cilium to transcriptional activation in the nucleus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106:21666-21671.
- Kozminski KG, Johnson KA, Forscher P, Rosenbaum JL. 1993. A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5519-23.

- Li JB, Gerdes JM, Haycraft CJ, Fan Y, Teslovich TM, et al. 2004. Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene. *Cell* 117(4):541-52
- Liu W, Xu S, Woda C, Kim P, Weinbaum S, Satlin LM. 2003. Effect of the flow and stretch on the $[Ca^{2+}]_i$ response of principal and intercalated cells in cortical collecting duct. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 285:F998-1012.
- Mathew LK, Sengupta S, Franzosa J, Perry J, La Du J, Andreassen EA, Tanguay RL. 2009. Comparative Expression Profiling Reveals an Essential Role for Raldh2 in Epimorphic Regeneration. *J. of Biol. Chem.*, 10-15.
- Minamishima YA, Nakayama K, Nakayama KI. 2002. Recovery of Liver Mass without Proliferation of Hepatocytes after Partial Hepatectomy in Skp2-deficient Mice. *Cancer Research*, 62:995-999.
- Murcia NS, Richards WG, Yoder BK, et al. 2000. The Oak Ridge Polycystic Kidney (orpk) disease gene is required for left-right axis determination. *Development*, 127:2347-2355.
- Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, et al. 2003. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat. Genet.* 33:129-37.
- Nauli SM, Zhou J. 2004. Polycystins and mechanosensation in renal and nodal cilia. *Bioessays* 26(8):844-56.
- Nechiporuk A, Keating MT. 2002. A proliferation gradient between proximal and msxb-expressing distal blastema directs zebrafish fin regeneration. *Development*, 129:2607–2617.
- Odenthal J, van Eeden JM, Haffter P, Ingham PW, Nusslein-Volhard C. 2000. Two distinct cell populations in the floor plate of the zebrafish are induced by different pathways. *Dev Biol*, 219:350-363
- Pedersen LB, Veland IR, Schroder JM, Christensen ST. 2008. Assembly of primary cilia. *Dev. Dyn*, 237:1993–2006.
- Piperno G, Mead K. 1997. Transport of a novel complex in the cytoplasmic matrix of Chlamydomonas flagella. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4457-62.
- Poleo G, Brown CW, Laforest L, Akimenko MA. 2001. Cell proliferation and movement during early fin regeneration in zebrafish. *Dev. Dyn.*, 221:380–390.
- Poole CA, Jensen CG, Snyder JA, Gray CG, Hermanutz VL, Wheatley DN. 1997. Confocal analysis of primary cilia structure and colocalization with the Golgi apparatus in chondrocytes and aortic smooth muscle cells. *Cell Biol. Int.* 21:483-96.
- Poss KD, Shen J, Nechiporuk A, McMahon G, Thisse B, Thisse C, Keating MT. 2000. Roles for Fgf signaling during zebrafish fin regeneration. *Dev. Biol.*, 222:347-358.
- Poss KD, Keating MT, Nechiporuk A. 2003. Tales of Regeneration in Zebrafish. *Dev Dynamics*, 226:202-210.
- Praetorius HA, Spring KR. 2001. Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium. *J. Membr. Biol.* 184:71-79.
- Praetorius HA, Spring KR. 2003. Removal of the MDCK cell primary cilium abolishes flow sensing. *J. Membr. Biol.* 191:69-76.
- Praetorius HA, Spring KR. 2005. A physiological view of the primary cilium. *Annu. Rev. Physiol.*, 67:515-29.
- Quint E, Smith A, Avaron F, Laforest L, Miles J, Gaffield W, Akimenko MA. 2002. Bone patterning is altered in the regenerating zebrafish caudal fin after ectopic expression of sonic hedgehog and bmp2b or exposure to cyclopamine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 99: 8713–8718.
- Rink JC, Gurley KA, Elliott SA, Shanchéz Alvarado A. 2009. Planarian Hh Signaling Regulates Regeneration Polarity and Links Hh Pathway Evolution to Cilia. *Science*. 326:1406-1410.

- Rohatgi R, Milenkovic L, Scott M. 2007. Patched1 regulates Hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* 317, 372–376.
- Santamaria JA, Mari-Beffa M, Santos-Ruiz L, Becerra J. 1996. Incorporation of bromodeoxyuridine in regenerating fin tissue of the goldfish *Carassius auratus*. *J. Exp. Zool*, 275:300–307.
- Santos-Ruiz L, Santamaria JA, Ruiz-Sanchez J, Becerra J. 2002. Cell proliferation during blastema formation in the regenerating teleost fin. *Dev. Dyn.*, 223:262–272.
- Satir P, Pedersen LB, Christensen ST. 2010. The primary cilium at a glance. *J. Cell Science*, 123:499-503.
- Schneider L, Cammer M, Lehman J, Nielsen SK, Guerra CF, *et al.* 2010. Directional Cell Migration and Chemotaxis in Wound Healing Response to PDGF-AA are Coordinated by the Primary Cilium in Fibroblasts. *Cell Physiol Biochem*, 25:279-292.
- Schwartz EA, Leonard ML, Bizios R, Bowser SS. 1997. Analysis and modeling of the primary cilium bending response to fluid shear. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 272:F132:38.
- Sekimizu K, Nishioka N, Sasaki H, Takeda H, *et al.* 2004. The zebrafish iguana locus encodes Dzip1 , a novel zinc-finger protein required for proper regulation of Hedgehog signaling. *Development*, 131:2521-2532.
- Smith A, Avaron F, Guay D, Padhi BK, Akimenko MA. 2006. Inhibition of BMP signaling during zebrafish fin regeneration disrupts fin growth and scleroblasts differentiation and function. *Dev. Biol.*, 299:438–454.
- Stoick-Cooper CL, Moon RT, Weidinger G. 2007. Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine. *Genes Dev*, 21:1292-1315.
- Tay SY, Yu X, Wong KN, Panse P, *et al.* 2010. The Iguana/DZIP1 Protein Is a Novel Component of the Ciliogenic Pathway Essential for Axonemal Biogenesis. *Dev. Cell*, 239:527-534.
- Tazaki A, Kitayama A, Terasaka C, Watanabe K, Ueno N, Mochii M. 2005. Microarray-based analysis of tail regeneration in *Xenopus laevis* larvae. *Dev Dynamics*, 233(4):1394-404.
- Thisse B, Thisse C. 1998. High resolution whole-mount in situ hybridization in zebrafish. *Sci. Mon* 5:8-9.
- Verghese E, Weidenfeld R, Bertam JF, Ricardo SD, Deane JA. 2008. Renal cilia display length alterations following tubular injury and are present early in epithelial repair. *Nephrol. Dial. Transplant*, 23:834-841.
- Verghese E, Ricardo SD, Weidenfeld R, Zhuang J, Hill PA, Langham RG, Deane JA. 2009. Renal Primary Cilia Lengthen after Acute Tubular Necrosis. *J. Am. Soc. Nephrol*, 20:2147-2153.
- Wheatley DN. 1995. Primary cilia in normal and pathological tissues. *Pathology* 63:222-38.
- Whitehead GG, Makino S, Lien CL, Keating MT. 2005. fgf20 Is Essential for Initiating Zebrafish Fin Regeneration. *Science*, 310:1957-1960.
- Whitfield JF. 2003. Primary cilium – is it an osteocyte's strain-sensing flowmeter? *J. Cell Biochem*. 89:233-37.
- Williams PL, Warwick P, Dyson M, Bannister LH, eds. 1989. Cells and tissues. In *Grays Anatomy*, pp. 31-33. London: Churchill Livingstone. 37th ed.
- Wolff C, Roy S, Lewis K, *et al.* 2004. iguana encodes a novel zinc-finger protein with coiled-coil domains essential for Hedgehog signal transduction in the zebrafish embryo. *Genes Dev.*, 18:1565-1576.
- Zhang Q, Murcia NS, Chittenden LR, Richards WG, *et al.* 2003. Loss of the Tg737 Protein Results in Skeletal Patterning Defects. *Dev. Dynamics*, 227:78–90.